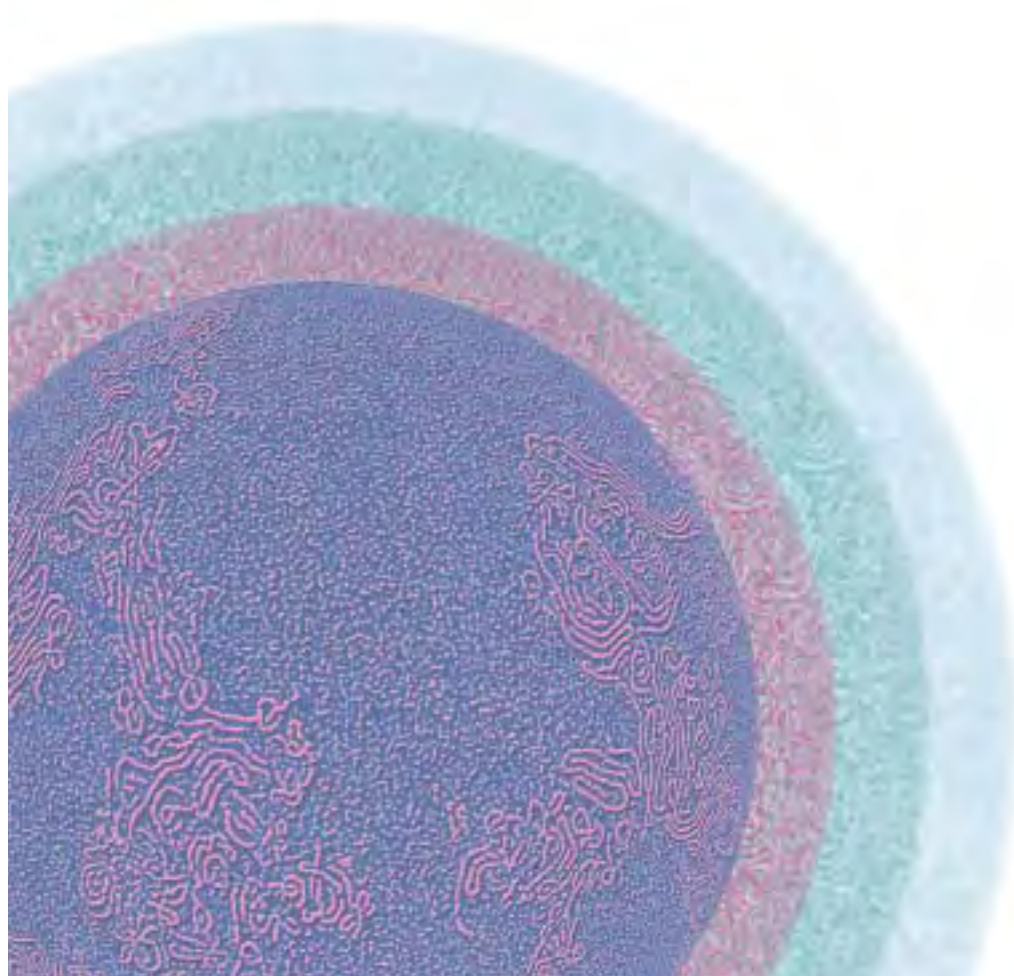


GenomiPhi

DNA Amplification Kit

ゲノムDNA調製試薬

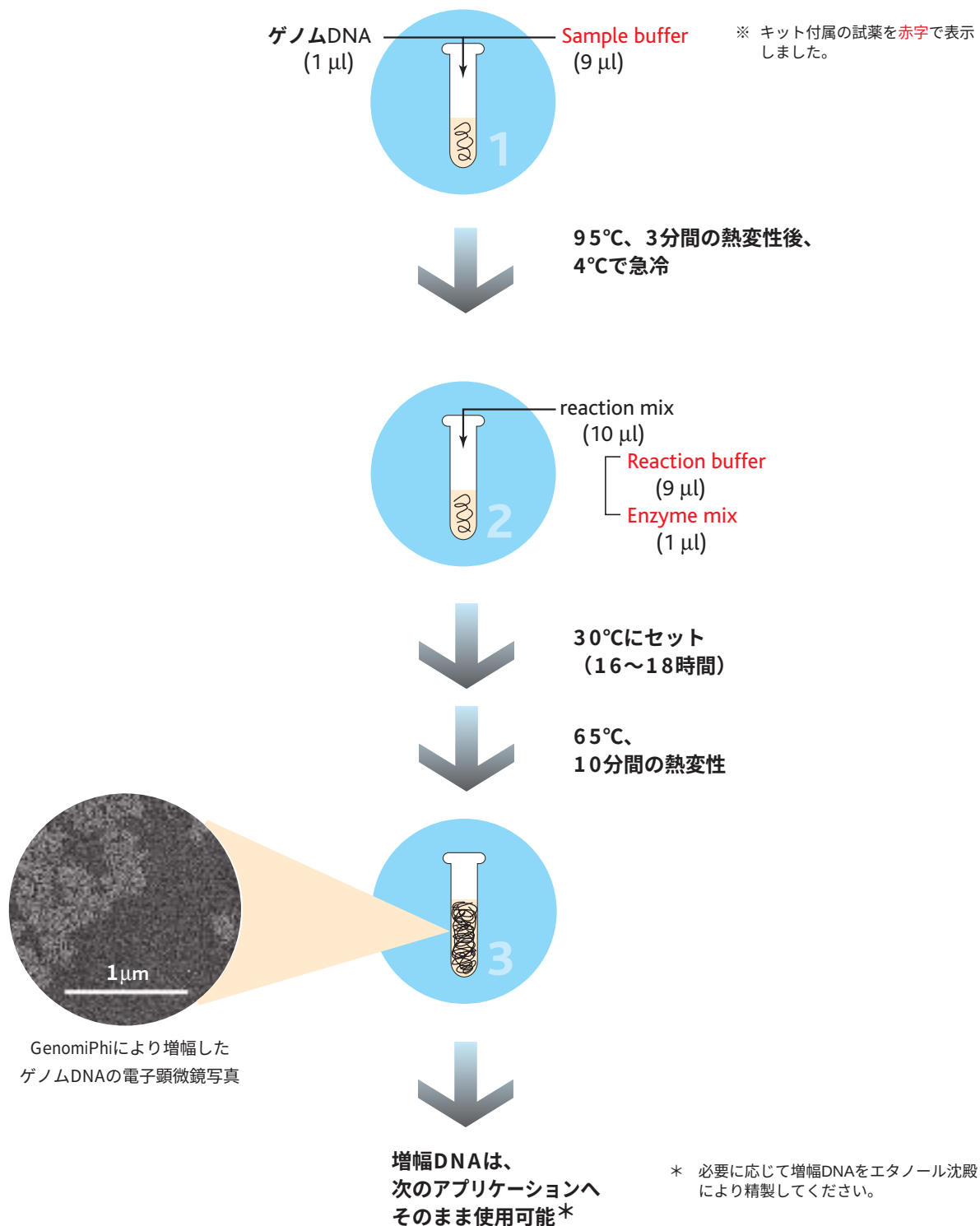
完全テクニカルハンドブック ver.2



GenomiPhi

DNA Amplification Kit 簡易プロトコール

ゲノムDNA／血液・口腔粘膜から簡易精製したゲノムDNAなどから
さまざまなアプリケーションに使用可能な高分子DNAを簡単調製！



GenomiPhi

DNA Amplification Kit

完全テクニカルハンドブック ver.2



GenomiPhiユーザー登録のお願い

GenomiPhiをご購入いただきましたすべてのお客様に満足して製品をご使用いただくために、皆様の実験結果をお伺いし、ご満足いただけるまでサポートを行いたいと考えております。今後、リアルタイムでの情報提供も考えておりますので、大変恐れ入りますが、弊社からコンタクトすることにご了承いただける方は、このページをコピーして各項目にご記入の上、下記番号までファクシミリにてご送付ください。

(すでにユーザー登録された方は、再度ご登録いただく必要はありません)

バイオダイレクトライン FAX 03-5331-9370		
ふりがな	姓 名	
ご氏名		
所属	機関 (大学、会社等)	
	部門 (学部・研究室等)	
	研究室 (室・部署等)	
	所在地	〒(7桁) 都道府県
	ご職位	☐ 大学教授 ☐ 大学助教授 ☐ 大学講師・助手 ☐ 大学院生・ポスドク ☐ 大学生・研究生 ☐ 公的研究所研究マネージャー ☐ 公的研究所研究員 ☐ 民間研究所研究マネージャー ☐ 民間研究所研究員 ☐ その他 ()
ご連絡先	TEL	- (内線)
	FAX	-
	メールアドレス*	
* 弊社では、e-mail 情報配信サービス「バイオダイレクトメール」で、最新の製品、技術情報、キャンペーン情報などをお送りしています。 配信登録をご希望の方は上欄にメールアドレスをご記入ください。		
現在GenomiPhiの使用について何かお困りのことがございましたら、簡単にご記入下さい。		



Contents ● ● ●

1. はじめに.....	5
1.1 GenomiPhiとは.....	5
1.2 キットの構成.....	6
1.3 製品の品質.....	6
1.4 ホームページ上の製品情報.....	6
2. プロトコール.....	7
2.1 概略.....	7
2.2 GenomiPhiによるゲノムDNA増幅反応.....	7
2.3 Control DNAの増幅（コントロール反応）.....	9
2.4 増幅DNAの定量.....	9
2.5 増幅DNAの精製.....	11
3. 製品Q&A	12
4. トラブルシューティング.....	16
5. アプリケーションノート.....	19
5.1 口腔粘膜細胞からのゲノム全領域増幅.....	19
5.2 簡易抽出血液ライセートからのゲノム全領域増幅.....	21
5.3 Blood Cardからのゲノム全領域増幅.....	24
5.4 増幅DNAを鋳型としたPCR.....	27
5.5 multiplex PCR用サンプルとしての増幅DNAの利用.....	31
5.6 GeneChip HuSNP Mapping AssayでのGenomiPhi増幅DNAの利用.....	34
5.7 GenomiPhi 増幅DNAを用いたSTR解析.....	37
5.8 ゲノムDNA増幅におけるTaq およびPhi29 DNA polymeraseの比較検討.....	39
5.9 GenomiPhi増幅DNAを用いた エキソヌクレアーゼIII遺伝子のクローニングと発現.....	43
5.10 微生物のゲノムプロジェクト.....	46
参考文献	48
付録 Phi Circle（お客様の声・データ紹介）.....	49～55



注意！ GenomiPhiをご使用の皆様へ

製品を安全かつ有効にご使用いただくため、あらかじめ本マニュアルをご通読ください。

本製品は試験研究用です。人、動物への医療・診断用としては使用できません。本製品を使用する際には細心の注意を払ってください。実験中は適切な保護衣を常に着用し、試薬が皮膚や眼球等に直接触れたり、体内に入ることのないよう注意深く取り扱ってください。試薬に触れた場合にはすぐに水で洗ってください。



製品は受け取り後すぐに -70°C （または -80°C ）のフリーザーで保存してください。酵素以外のコンポーネントについては -20°C での保存も可能です。製品を使用する際には必ず温度を $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ に保ってください。また、反応を開始する前はどのコンポーネントも 4°C 以上にしないようご注意ください。

製品内容、使用方法等につきましては、下記までご連絡ください。

GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社

TEL： 03-5331-9336（バイオダイレクトライン）

FAX： 03-5331-9370

e-mail: Tech-JP@ge.com

Copyright© 2004 GE Healthcare

全ての著作権は、GE Healthcareが所有します。正式に文書として発行されたGE Healthcareの許可がない場合は、いかなる意味、方法、場合においても、本取扱説明書の複製や改定、複写、配布、検索システムなどの作成や引用、転載を禁じます。

はじめに

1.1 GenomiPhiとは

GenomiPhi DNA Amplification Kit（以下GenomiPhi）は、直鎖状のゲノムDNAを鋳型とし従来にはユニークな様式によってDNAを増幅させるキットです。GenomiPhiにはPhi29 DNA polymeraseが用いられており、この酵素によって30°Cの一定温度で指数関数的にDNAを増幅し、鎖置換反応を行うことが可能となりました（図1-1）。反応には温度可変式のサーマルサイクラーは必要ありません。16～18時間反応させることで、ナノグラムのDNAからマイクログラムのDNAが増幅されます。また、Phi29 DNA polymeraseには校正活性があるため、きわめて正確にDNAが増幅されます。

GenomiPhiに用いる出発材料には精製したDNA（1 ngの微量DNA）や簡易精製した細胞破碎液が使用できます。市販の抽出キットや研究室オリジナルのプロトコールによって精製したゲノムDNAも使用可能です。GenomiPhiによって増幅されたDNAはごく一部に一本鎖DNAを含むものの、多くは高分子の二本鎖DNAの形状をとっています。また、増幅DNAにはDNAの3'末端から500ベース以内の部分は含まれません。多くの場合、反応後の増幅DNAは精製せずにそのまま使用することができますが、次に行う実験によっては精製する必要があります。精製にはエタノール沈殿法をおすすめしています。

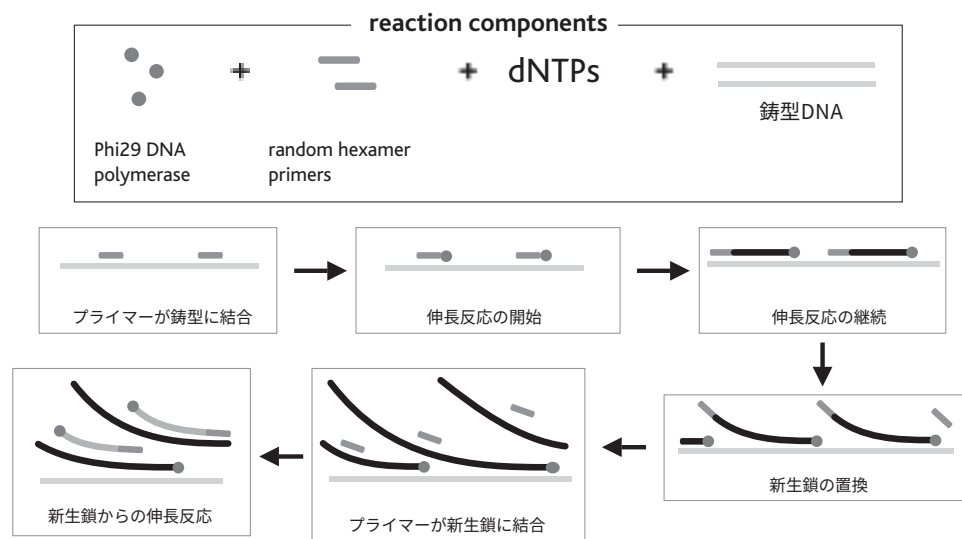


図1-1. GenomiPhiによるDNA増幅過程

プライマーがゲノムDNAに複数箇所でアニールします。Phi29 DNA polymeraseが一本鎖の直鎖DNA上で一斉に複製を開始します。合成が進むにしたがい、相補鎖の置換により新たな一本鎖DNAが生じます（鎖置換反応）。続いて、合成された一本鎖DNAにプライマーがアニール、相補鎖置換しながら複製が進み二本鎖DNAが形成されます。

1.2 キットの構成

コンポーネント (キャップの色)	25-6600-01	25-6600-02	保存温度
Sample buffer (緑)	1 × 0.9 ml	5 × 0.9 ml	-70℃または-20℃
Reaction buffer (青)	1 × 0.9 ml	5 × 0.9 ml	-70℃または-20℃
Enzyme mix (黄)	1 × 100 µl	5 × 100 µl	-70℃
Control DNA (10 ng/µl λ DNA)	1 × 20 µl	5 × 20 µl	-70℃または-20℃

キットに含まれていない試薬

- ☐ 滅菌蒸留水
- ☐ TE バッファー
(10 mM Tris、1 mM EDTA、pH 8.0)
- ☐ 100% エタノール (オプション：増幅反応後の精製が必要な場合に使用)
- ☐ 70% エタノール (オプション：増幅反応後の精製が必要な場合に使用)
- ☐ 酢酸ナトリウム/EDTA溶液 (オプション：増幅反応後の精製が必要な場合に使用)
3 M 酢酸ナトリウムと0.5 M EDTA (pH 8.0) を等量混ぜて調製してください。
- ☐ アルカリ溶液 (オプション：血液細胞、口腔粘膜細胞を用いる場合に使用)
(400 mM KOH, 100 mM DTT, 10 mM EDTA)
- ☐ 中和溶液 (オプション：血液細胞、口腔粘膜細胞を用いる場合に使用)
(400 mM HCl, 600 mM Tris-HCl, pH 0.6)

1.3 製品の品質

本製品はヒトゲノムDNA 10 ngを鋳型として30℃、18時間の反応で4～7 µgのDNAを増幅できることを確認しています。また、品質確認のため、増幅DNAを鋳型に用いて、それぞれ異なった染色体上にある5種類のプライマーによるreal-time PCRを行っています。さらに、ネガティブコントロール反応で生じる非特異的な増幅DNAがヒトゲノムDNA由来でないこともreal-time PCRにより確認しています。

1.4 ホームページ上の製品情報

弊社ホームページ (www.gehealthcare.co.jp/lifesciences) でGenomiPhiの最新情報が入手できます。

プロトコール

2.1 概略

キットにはSample buffer, Reaction buffer, Enzyme mixの3種類の反応試薬とControl DNAが入っています。Reaction bufferには塩とヌクレオチドが含まれており、Phi29 DNA polymeraseの酵素反応の緩衝の役割を果たします。

まず、1 μ lの鋳型DNAに9 μ lのSample bufferを加えて、95°Cで3分間熱変性します。水中で冷却した後に、9 μ lのReaction bufferと1 μ lのEnzyme mixを混ぜて、30°Cで一晩（16～18時間）反応させます。反応終了後は酵素を失活させるために、65°Cで10分間熱処理します。増幅反応後のDNAはそのまま用いることができます。また、精製してから使用することも可能です。

2.2 GenomiPhiによるDNA増幅反応

ここでご紹介するのは標準的なプロトコールです。ご使用の実験系に応じてプロトコールを至適化することをおすすめします。反応溶液中のpd(N)₆どうしによって鋳型DNAのない条件下でもGenomiPhi増幅が生じることがあります。

特にGenomiPhiの反応を至適化する必要がなければ、以下の標準プロトコールのステップ1) から始めてください。本誌の表紙裏に簡易プロトコールをご紹介します。反応条件を至適化する場合や実験の際の覚え書きとしてご活用ください。

1) Sample bufferとReaction bufferを氷上で溶かします。

2) Sample buffer 9 μ lを0.5 ml遠心チューブ*に入れます。

3) チューブに鋳型サンプル1 μ lを加えます。

Note

キットの構成

- Sample buffer (緑)
- Reaction buffer (青)
- Enzyme mix (黄)
- Control DNA

※ () 内はキャップの色です。詳細は1.2をご参照ください。

反応に用いるサンプル

GenomiPhiの反応（20 μ lの標準反応）には1 μ l以上のサンプルを添加しないでください。また、高濃度のSDS、EDTA、血液由来のヘム色素が含まれるサンプルはPhi29 DNA polymeraseの酵素活性を阻害するため使用しないでください。GenomiPhiの反応では精製DNAが最も増幅効率が良いで、制限酵素処理したDNAやニックが多く入ったDNA、ホルマリン固定したサンプルから抽出したDNAや長期間4°Cに保存したDNAでは反応効率が低下します。

◆ 精製DNAを用いる場合

水またはTE バッファー（10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0）で1 ng/ μ lに濃度調整したDNAを1 μ l（1 ng）取り、Sample buffer 9 μ lと混合してチューブの蓋を閉めます（プレートを使用の場合も蓋もしくはシールをしてください）。→ステップ4)へ進む

◆ 血液細胞を用いる場合

末梢血液20 μ lに生理食塩水やPBSなど40 μ lを添加して3倍に希釈してください。よく混合してから、アルカリ溶液（400 mM KOH, 100 mM DTT, 10 mM EDTA）を60 μ l添加します。丁寧にタッピングして混合し、氷上で10分間インキュベートします。その後、中和溶液（400 mM HCl, 600 mM Tris-HCl, pH 0.6）を60 μ l加えてよく混合します。この最終溶液を最大で1 μ l取り、Sample buffer 9 μ lと混合してチューブの蓋を閉めます（プレートを使用の場合も蓋もしくはシールをしてください）。→ステップ4)へ進む

* チューブのほか、96 ウェルプレート、384 ウェルプレートなども使用可能です。なお、反応中の蒸発を防止し、反応後の増幅DNAを保存するのに適した蓋が閉められるものやシールできるプレートをご使用ください。

◆ 口腔粘膜の細胞を用いる場合

綿やポリエステル製の消毒綿棒などを用いて採取した口腔粘膜の細胞を遠心チューブに移し、1× PBS バッファーを400 µl加えます。アルカリ溶液（400 mM KOH, 100 mM DTT, 10 mM EDTA）を400 µl添加し、ボルテックスで軽く混和します。氷上で10分間インキュベートし、次に中和溶液（400 mM HCl, 600 mM Tris-HCl, pH 0.6）を400 µl加えてよく混合します。この最終溶液を最大で1 µl取り、Sample buffer 9 µlと混合してチューブの蓋を閉めます（プレートを使用の場合も蓋もしくはシールをしてください）。→ステップ4）へ進む

* 95°C以上の温度、あるいは3分間以上インキュベートするとDNAにニックが入り、反応効率が低下します。反応条件を厳守してください。

- 4) サンプルを変性させます。95°C、3分間インキュベートしてください。その後4°Cに氷冷します*。
- 5) reaction mixを調製します。1反応あたり9 µlのReaction bufferと1 µlのEnzyme mixを氷上で混ぜます。この10 µlのreaction mixをステップ4）で熱変性したサンプルと混ぜて丁寧に混合します。

試薬取り扱いのポイント

Reaction bufferとEnzyme mixはサンプルに添加する直前に必ず氷上で混合してください。reaction mixにはPhi29 DNA polymerase、反応バッファー、ランダムヘキサマープライマー、ヌクレオチドが含まれているため、鋳型DNAがない条件でも溶液の温度が上がるだけで増幅が起こります。また、サンプル数が多い場合は、reaction mixを数反応分まとめて1本のチューブに調製し、分注して使用することもできます。reaction mixは必ず即日使用してください。残ったreaction mixは保存せずに捨ててください。

- 6) 30°Cで16～18時間インキュベートします。チューブに蓋をして蒸発を防いでください。

反応時間のポイント

GenomiPhiは30°C、16～18時間の標準反応で増幅DNAが最大量得られるように至適化されています。通常、反応溶液中のヌクレオチドが完全に消費されても、24時間まではPhi29 DNA polymeraseによる分解反応は起こりません。また、増幅反応は指数関数的に進むため、16時間よりも短い反応時間では増幅効率が一定せず、安定したデータが得られません。

- 7) 酵素を失活させます。65°Cで10分間インキュベートし、4°Cに冷却します。

熱失活ステップ

このステップではPhi29 DNA polymeraseのポリメラーゼ活性とエキソヌクレアーゼ活性を失活させます。残存するPhi29 DNA polymeraseのポリメラーゼ活性が、増幅後に行う反応を阻害する可能性があります。また、増幅DNAを長期間保存する場合、エキソヌクレアーゼ活性を除かないと増幅DNAが分解されます。

- 8) 増幅DNAはすぐに実験に使用することができます。4°Cまたは-20°Cで保存することも可能です。

- 9) 【オプション】増幅DNAを精製します。

アプリケーションによっては、増幅DNAを未精製で用いると、GenomiPhiの反応後の溶液に残存するコンポーネントによって影響を受けるものがあります。基本的に、uniplex PCRや多くのSNP解析実験では増幅DNAは精製せずにそのまま使用できますが、multiplex PCRに用いる場合、精製すると反応効率が向上する場合があります。反応後の溶液から99%のヌクレオチドとプライマーを除去する方法として11ページにエタノール沈殿法をご紹介します。

Note

増幅DNAは高分子で、少ない溶液中に濃縮されて存在するため、反応後の溶液には粘性が生じる場合があります。粘性によってピペット操作が困難な場合、水またはTE バッファーを用いて反応溶液を希釈してください。

2.3 Control DNAの増幅（コントロール反応）

キットにはコントロール反応用のDNAとしてλファージDNA（10 ng/μl）が20 μl入っています。コントロール反応を行う場合、1 μl（10 ng）を9 μlのSample bufferと混ぜて、プロトコール2.2のステップ4）～8）の操作を行ってください。コントロール反応では通常、30℃、16時間で4 μg以上のDNAを増幅できます。

- 1) Control DNA 1 μl（10 ng）をSample buffer 9 μlに加えてください。
- 2) プロトコール2.2のステップ4）へ進んでください。

2.4 増幅DNAの定量

GenomiPhi増幅DNAは精製の有無にかかわらず定量することができます。精製していない場合には、PicoGreen dsDNA Quantification Kit（Molecular Probes、以下PicoGreen）を用いて定量してください。PicoGreenはラジオアイソトープを用いて正確に定量した場合とほぼ同等の結果が得られます。精製せずに増幅DNAを分光光度計で測定すると、残存するプライマーやヌクレオチドなどの影響によって正確に定量することができません。

定量法	増幅後精製	増幅後未精製
PicoGreen	○	○
分光光度計	○	×

定量のポイント

増幅DNAをPicoGreen、分光光度計それぞれで定量すると再現性のあるデータが得られますが、両者の測定データには20%程度の差が生じます。

◆ オプションA：分光光度計による定量（増幅DNAを精製した場合のみ）

- 1) 測定用サンプルの希釈に用いたものと同じ溶液（TEバッファーまたは水）をリファレンスとし、260 nmの吸光度を測定します。

注意：

UV測定可能なプレートリーダーを使用する場合には、ブランクを含むDNAの標準曲線を作成してください。

- 2) 増幅DNAサンプルについて260 nmの吸光度を測定し、濃度を計算します。

◆ オプションB：PicoGreen定量（マイクロタイタープレートによる測定）

PicoGreenによる定量では、用いる蛍光スキャナーによってダイナミックレンジが異なります。スキャナーの取扱説明書を参照して、直線性（定量性）の得られる範囲で測定してください。

- 1) TE bufferを調製します。PicoGreen付属の20× TE bufferを滅菌蒸留水で20倍希釈して1× TE bufferを調製してください。
- 2) PicoGreen試薬を25倍希釈します。1サンプルあたり100 μlの希釈PicoGreen試薬を用いるので、測定するサンプル数に応じて準備します。

試薬調製のポイント

PicoGreenはガラスに吸着するため、プラスチック製のチューブを用いて調製してください。また、PicoGreenは蛍光物質を含むため、できるだけ遮光してください。

Note

測定には容量が500 μl以下のセルの使用をおすすめします。

- 3) 標準曲線を作成するためのスタンダードDNAを調製します。信頼性のある標準曲線を作成するためにduplicateで調製することをおすすめします。下記の表のように、あらかじめTE bufferを加えておいたマイクロタイタープレートのウェルに10 ng/μlのλ DNAを加えてください。

Standard #	λ DNA(ng)	10 ng/μl λ DNA (μl)	1× TE buffer
1	600	60 μl	40 μl
2	500	50 μl	50 μl
3	400	40 μl	60 μl
4	200	20 μl	80 μl
5	100	10 μl	90 μl
6	50	5 μl	95 μl
7	25	2.5 μl	97.5 μl
8	0	0 μl	100 μl

- 4) 99 μlのTE bufferの入ったウェルにGenomiPhi増幅DNAを希釈せずに1 μl加えます。

増幅DNA添加のポイント

測定するサンプルが標準曲線をはずれると予想される場合には、増幅DNAをTE bufferで希釈してからウェルに添加してください。また、希釈した場合には、測定値に希釈率をかけて収量を計算してください。

- 5) 5倍希釈したPicoGreen試薬をスタンダードDNAおよびサンプルの入ったウェルに100 μlずつ添加します。ピペティングによりよく混合してください。
- 6) プレートを密閉して、必要に応じて軽く遠心（200× g, 1分間）します。
- 7) 蛍光スキャナーを用いて測定します。励起波長を約480 nm、蛍光波長を約520 nmに設定してください。PMTの電圧値は必要に応じてシグナル飽和を起こさないように調整します。

蛍光スキャナーの設定例（Typhoonを使用する場合）

	Typhoon 9400シリーズ	Typhoon 9200シリーズ
励起波長	488 nm	532 nm
蛍光フィルター	520BP	526SP

測定のポイント

PicoGreen試薬を添加してから5～10分以内に測定してください。また、測定を開始するまでは、できるだけサンプルを光にあてないようにしてください。

- 8) 作成した標準曲線より増幅DNAの濃度を出します。

2.5 増幅DNAの精製

エタノール沈殿法

増幅DNAの精製法で簡便かつ経済的なのがエタノール沈殿法です。エタノール沈殿法では1.5 M 酢酸ナトリウム／250 mM EDTA (pH 8.0) を使用し、すべての操作を室温で行います。

- 1) プロトコール2.2 のステップ7) の後に、サンプルを室温まで戻します。
- 2) 20 μ lの滅菌蒸留水をサンプル（20 μ lでGenomiPhiの反応を行った場合）に添加します。
- 3) 4 μ lの1.5M酢酸ナトリウム／250 mM EDTA (pH 8.0) を添加します。

酢酸ナトリウム／EDTA溶液を添加する時のポイント

サンプルに添加する前に酢酸ナトリウム／EDTA溶液とエタノールを混合しないでください。EDTAはエタノールに難溶のため沈殿が生じます。

- 4) 100 μ lの100%エタノールを添加します。エタノールの最終濃度は70%になります。

エタノール沈殿のポイント

エタノールを加えた後のサンプルを4°C以下に冷やしたり、エタノールの最終濃度が75%になると、ヌクレオチドやプライマーを十分除去できないので注意してください。

- 5) 12,000 rpm、室温で15分間遠心します。96ウェルプレートを用いる場合には、少なくとも2,500 $\times g$ で30分間遠心してください。
- 6) 上清を可能な限り除去します。96ウェルプレートを用いる場合には、プレートを逆さにして軽くスピンドウン（300 $\times g$ 、1分間以内）するだけでも十分です。
- 7) 250～500 μ lの70% エタノールで沈殿したDNAを洗浄します。サンプルに添加後、12,000 rpm、室温で1分間遠心してください。96ウェルプレートを用いる場合には、少なくとも3,200 $\times g$ で5分間遠心してください。
- 8) 上清を可能な限り除き、2～5分間、SpeedVacで乾燥させます。乾燥させすぎるとDNAが溶解しにくくなるので注意してください。
- 9) DNAをTEバッファーに溶解します。溶液量は次の実験系にあわせて適宜調整してください。

製品Q&Aー購入前の方へ

Q. 同じ酵素とプライマーを使用しているのになぜTempliPhi / TempliPhi LCは環状DNA(プラスミド/BAC)を増幅し、GenomiPhiはゲノムDNA (非環状DNA) を増幅するのですか？

A. 鋳型DNAの種類に適した増幅反応が起きるように、反応液の成分がそれぞれ至適化されています。反応液の組成は非公開です。

Q. Phi29 DNA polymeraseの酵素活性ユニットの定義を教えてください。

A. 1 unitは30℃、30分のインキュベーションで10 nmolのdNTPsが取り込まれるのに必要な酵素量です。

Q. 96 ウェルプレートの処理にかかる手作業の時間は？

A. 20分程度で、96ウェルプレートの反応を準備することができます。作業を自動化すればさらに手間を省くことができます。

Q. 増幅反応にかかる時間は？

A. 1 ng のDNA から増幅する場合、通常16~18 時間で増幅が完了します。ただし、細胞や組織のアルカリ溶解液をサンプルとして増幅する場合にはさらに時間がかかります。アルカリ溶解液に含まれている夾雑物が、Phi29 DNA polymeraseの酵素活性を低下させるためです。

Q. 1 µl以上のサンプルをSample buffer に加えることはできますか？（サンプルのDNA濃度が低いため、添加するサンプル量を増やしたいのですが？）

A. キットは1 µlのサンプル量で最大の効果が得られるように至適化されています。また、酵素活性を阻害する可能性がある夾雑物の混入を最小限にするためにも、添加するサンプル量は1 µlにしてください。

Q. 熱変性ステップ（95℃、3 分間）をスキップすることはできますか？

A. 熱変性を行わないと増幅効率が著しく低下するためおすすめしません。

Q. 熱変性ステップ（95℃、3 分間）を延長することはできますか？

A. 95℃の熱変性ステップの時間を延長すると、DNAにニックが入るためおすすめしません。

Q. 30℃より高い温度で増幅反応を行うことはできますか？

A. 推奨の温度（30℃）より高い温度で増幅反応を行うことはおすすめしません。Phi29 DNA polymeraseの活性が低下します。

Q. GC リッチやAT リッチのDNA を増幅することはできますか？

A. できます。GC リッチまたはAT リッチサンプルでも、ゲノム全体の増幅効率にはほとんど差がありません。

Q. RNA を増幅することはできますか？

A. できません。GenomiPhi は一本鎖や二本鎖のゲノムDNA を効率良く増幅できるように至適化されたキットです。

Q. BAC を増幅することはできますか？

A. おすすめしません。TempliPhi Large Construct DNA Amplification Kit（コード番号 25-6400-80）をご使用ください。

Q. 反応後、増幅DNAは精製する必要がありますか？

A. 原則的に増幅DNAを精製する必要はありません。GenomiPhi に使用されているランダムヘキサマーのTm値は低く設定されているため、PCRやPCRをベースとしたジェノタイピングなどのアプリケーションにおいて、増幅DNAをそのまま使用することができます。ただし、増幅後のアプリケーションで増幅DNAを鋳型としてプライマーと低温（例えば30 °C）でアニーリングを行う場合には、残存するランダムヘキサマーもアニーリングする可能性があるためGenomiPhi の反応液を精製する必要があります。

Q. 増幅DNAを凍結保存できますか？

A. GenomiPhiで増幅したDNAは、ゲノムDNAと同じように取り扱ってください。数日間であれば4 °Cで保存可能です。長期保存する場合には、-20°Cまたは-70°Cで保存してください。いずれの場合もGenomiPhiによる増幅反応の後、ただちに65°Cで10分間インキュベートして酵素を失活させてから保存してください。

Q. キットの保存方法は？

A. -70 °Cで保存してください。-80 °C、-85 °Cのフリーザーでも保存可能です。

Q. 試薬を4 °Cで保存できますか？

A. できません。

Q. GenomiPhiのEnzyme mixとReaction bufferを混合して保存しておくことは可能ですか？

A. 保存中に試薬が劣化して酵素反応の至適条件が維持できなくなりますので、おすすめしません。別々に保存してください。

Q. Control DNA はどのようなDNA ですか？

A. キットに含まれているControl DNA は、10 ng/μl のλ DNA です。コントロール反応では1 反応につき10 ng のDNA を使用してください。コントロール反応は、キットの性能を確認するために行います。

Q. キットに含まれている試薬の組成を教えてください。

A. 試薬の組成は社外秘となっています。

Q. Phi29 DNA polymeraseのみを購入できますか？

A. Phi29 DNA polymeraseのみの販売はしていません。

Q. パラフィン包埋組織からゲノムDNAを増やすことは可能ですか？

A. 抽出したDNAは10 kb以下の断片になっており、短いDNA断片では増幅効率がきわめて低いです。
また、抽出に用いられる試薬がPhi29 DNA polymeraseの酵素活性を阻害する可能性もあるためおすすめしません。

Q. 0.5~7 kbのcDNA断片を増幅することは可能ですか？

A. GenomiPhiは50 kb以上のDNAを増幅するように至適化されており、cDNAでは増幅効率が著しく低下するためおすすめしません。

Q. 植物のゲノムDNAを増やすことはできますか？

A. フェノールクロロホルム、水酸化ナトリウム、CTAB（臭化セシルトリメチルアンモニウム）などを用いて抽出したDNAで問題なく使用できます。増幅効率が低い場合には、GenomiPhi反応前にNucleon PhytoPure（コード番号：RPN8510、RPN8511）などにより植物ゲノムDNAを抽出・精製することをおすすめします。

Q. GenomiPhiの反応にCy3／Cy5ヌクレオチドのような修飾ヌクレオチドを添加してゲノムDNAを標識することはできますか？

A. GenomiPhiの反応で直接修飾ヌクレオチドを取り込ませることはできません。修飾の有無にかかわらずヌクレオチドを添加すると、あらかじめ反応系に入っているヌクレオチドの濃度が変わるため、増幅反応が阻害される可能性があります。GenomiPhiで増幅後、それを鋳型として標識反応を行ってください。

Q. GenomiPhi増幅DNAを用いてCGH Microarray実験を行うためのCyDye標識方法について教えてください。

A. ラベリングには2～5 μgのGenomiPhi増幅DNAを使用し、弊社のCy3とCy5を用いてNick Translation Kit（弊社）またはInvitrogenのBioprime Labeling kitにて行います（Pollack *et. al Nat Genet.* **23**: 41-46, 1999）。また、標識反応の前後でDNAの精製が必要です。CyDye標識されたプローブの平均サイズは300～1,000 basesで、ハイブリダイゼーションに使用するプローブ量は約35 pmolです。ハイブリダイゼーションの条件は使用するスライドとターゲットによって変わるので予備検討することをおすすめします。

Q. Guthrie cardやFTA paper、IsoCode Cardから抽出されたDNAを鋳型としてGenomiPhiで増幅することは可能ですか？

A. 可能です。詳細はアプリケーションノート（24ページ）をご参照ください。

Q. メチル化DNAは増幅できますか？

A. 可能です。ただし、増幅DNAにはメチル化の情報は保存されません。

Q. 血清からGenomiPhiでゲノムDNAを増幅できますか？

A. 血清にはゲノムDNAがほとんど含まれていないので増幅できません。

Q. 毛根あるいは精子（1細胞）から直接ゲノムDNAをGenomiPhiで増幅することは可能ですか？

A. 毛根あるいは精子（1細胞）をGenomiPhiで増幅した例はありません。1 ng（100細胞相当）以上の精製したゲノムDNAから増幅してください。

Q. PEP法などで増幅させるときは通常4回増幅させそれぞれの増幅産物をプールさせたものをSNP Genotypingの鋳型として使いますが、GenomiPhiも同じように数回分の反応産物をプールさせそれらを鋳型とし、その後のアプリケーションに使用したほうが正確性がで良いのでしょうか？

A. PEP法などは増幅中にバイアスがかかるため、1つの鋳型DNAから数回同じ条件の反応を繰り返し行い、それらをプールします。GenomiPhiの場合はPEP法やDOP-PCR法と比べてバイアスがかからずに増幅できるので、1 ng以上のDNAを1回反応するだけでGenotypingに使用しても問題ない品質のDNAが得られます。

Q. GenomiPhiの反応に用いる鋳型DNAのサイズに制限はありますか。また、GenomiPhiで増幅されるDNAのサイズはどのくらいですか？

A. 鋳型には50 kb以上のDNAを用いてください。50 kb以下のDNAでは増幅効率が低下します。なお、GenomiPhi増幅DNAのサイズは10～50 kbです。

Q. single cellから抽出したゲノムDNAを鋳型に用いてGenomiPhiで増幅することは可能ですか？

A. 1コピーのゲノムDNAからはほとんど増幅されません。

Q. ウリジンを含むDNAを鋳型に用いて増幅することは可能ですか？また、その場合増幅DNAはどのようになりますか？

A. 可能です。ただし、増幅DNAではウリジンはチミンに置換されます。

Q. GenomiPhi増幅DNAをmultiplex PCRにて増幅することは可能ですか？

A. アプリケーションノート（31ページ）でご紹介するmultiplexバッファーを用いてPCRを行なってください。もしくはPCRに使用するTaq polymeraseを増やすか、増幅したDNAを精製してからmultiplex PCRを行ってください。詳細はアプリケーションノートをご参照ください。

Q. GenomiPhi増幅DNAを精製せずに、直接SNUPe反応に使用できますか？

A. GenomiPhi増幅DNAを直接SNUPe反応に用いることはできません。まず初めに、GenomiPhi増幅DNAからPCRでSNP領域を増幅させ、それからSNUPe反応を行なう必要があります。

Q. 対立遺伝子欠落(Alelic dropout)を解析するのにGenomiPhiは使用できますか？

A. 使用可能です。弊社での実験ではABI Prism Linkage Mapping Set v2.5を使用して400個のマーカーに関してそれぞれ3回ずつ解析を行ない、対立遺伝子欠落(Alelic loss)はGenomiPhi増幅DNAで全体の0.4%、精製したゲノムDNAで全体の0.6%といった同等の結果が得られました。

Q. GenomiPhi増幅DNAはRFLP解析に使用できますか？

A. GenomiPhi増幅DNAはPCRに使用でき、かつ制限酵素処理も可能なため、RFLP解析でも問題なく使用できます。

Q. GenomiPhiのプロトコールで熱変性のステップは必要ですか？

A. 必要です。PCRによるDNAの増幅と同様に、二本鎖で高次構造のゲノムDNAを一本鎖にすることで、ランダムヘキサマーがアニールしやすくなります。

Q. 1 ng以下のゲノムDNAからGenomiPhiで増幅できますか？

A. おすすめしません。1 ng以下の鋳型量では、GenomiPhi増幅DNAを利用したアプリケーションでのデータの信頼性が低くなる可能性があります。

Q. ホルマリン固定したサンプルからゲノムDNAを抽出してGenomiPhiで増幅することはできますか？

A. ホルマリン固定した組織からのDNA抽出は、DNAがタンパク質と結合しているため困難です。また、この場合のDNA抽出条件では、抽出されたDNAは細かく切断されている可能性が高く増幅効率はきわめて低くなります。

Q. GenomiPhi増幅DNAをニックトランスレーション法によりRI/non-RI標識することは可能ですか？

A. 可能です。ニックトランスレーションで標識する前に、増幅DNAをエタノール沈殿で精製してください。標識反応には2~5 µgの増幅DNAを使用してください。RI標識の他にCy3またはCy5-dCTPを使用してCy3/Cy5標識することができます。

Q. GenomiPhi増幅DNAを精製した後、滅菌水とTEバッファーのどちらに溶解するのがよいですか？

A. 精製した増幅DNAはTEバッファーに溶解して冷凍保存してください。

トラブルシューティング

ケース1. DNAが増幅しない。

通常、DNAが増幅しないということはありません。反応終了後、サンプル1 μ lを0.6% アガロースゲル電気泳動で確認してください。増幅が起こらない原因と解決方法について以下に示します。

1. サンプルに反応を阻害する物質が混入している。

最も良い解決方法は可能な限りサンプルを希釈することです。血液サンプルに含まれるヘム色素などの生体物質はPhi29 DNA polymeraseの酵素活性を阻害します。また、細胞の溶解に使用されるSDSなどのイオン性界面活性剤も阻害物質として働きます。GenomiPhiの反応はこのような物質の影響を受けやすいため、収量が大きく減少します。したがって、GenomiPhiの反応に細胞や組織の破碎液を添加する場合、添加するサンプル量を可能な限り少なくすることが重要です。少量を添加することが難しい場合には、添加する前にPBSや滅菌蒸留水でサンプルを希釈して、最大でも1 μ lを反応溶液に添加してください。1 μ l以上添加することはおすすめしません。

また、至適条件を検討する場合、添加するサンプルを2倍希釈系列で調製して、反応溶液に1 μ lを添加することが確実な方法です。反応後、電気泳動で最も増幅効率の良いサンプルを確認してください。また、キットに添付のControl DNAも確認に適しています。

2. 反応に用いるDNAの品質が低い。

GenomiPhiの反応では精製DNAを用いる場合に最も増幅効率が高くなります。制限酵素処理したDNAやニックの入ったDNAでは、増幅効率が低下します。反応に添加する前のサンプル精製のステップではDNAに損傷を与えないように注意してください。

3. 十分量のDNAが入っていない。

極少量のDNA（100コピー以下）では均一に増幅されません。最低でも1 ng のDNA、または 3×10^5 cells、またはそれに相当するDNA 量を使用してください。

4. 酵素が失活している。

Phi29 DNA polymeraseは -70°C で保存してください（ -80°C 、 -85°C のディープフリーザーで保存することも可能です）。2ヶ月以内にキットを使い切る場合には、 -20°C で保存することも可能です。また、霜取り機能のついた冷凍庫では保存しないようにしてください。酵素の活性を調べる場合には、キットに添付されているControl DNAを用いて反応を行ってください。

5. 増幅DNAの収量が低い。

きわめて微量のDNAからの増幅が可能ですが、至適条件を検討する場合には、用いるサンプルに応じて幅広い条件設定で反応してください。

6. 変性が不十分。

95°C、3分間の熱変性で、鋳型DNAを変性してプライマーをアニールさせることができます。95°C以上の温度、あるいは3分間以上インキュベートするとDNAにニックが入り、反応効率が低下するため、反応条件を厳守してください。

ケース2 GenomiPhi増幅DNAを用いた実験で結果が思わしくなかった。

鋳型DNAがない場合でも増幅DNAは生じます。これはプライマーダイマー由来の非特異的な増幅産物です。また、微量DNAから指数関数的に増幅させるため、目的外のDNAが混入していると非特異的な増幅反応の原因となります。

1. 増幅が起こらない。

反応終了後のサンプル1 µlを0.6% アガロースゲル電気泳動で確認してください。DNAが確認できない場合には、上述のケース1をご参照ください。

2. DNAのない条件で非特異的に増幅している。

鋳型DNAのない条件下でもGenomiPhiの増幅が起こることがあります。鋳型の希釈系列を調製して、目的産物の増幅効率が最もよい至適条件を検討してください。

3. 雑菌などが混入したDNAを用いたために非特異的に増幅している。

雑菌などがごく微量混入していた場合、雑菌由来のDNAからでも増幅反応は起こります。実験に用いるチューブやピペットチップは滅菌したものを使用してください。

4. 反応終了後の増幅DNAの溶液に次の反応を阻害する物質が含まれている。

multiplex PCRのように、いくつかの実験によっては増幅DNAを精製する必要があります。エタノール沈殿法により精製してから次の実験に使用してください。

アプリケーションノート

5.1 口腔粘膜細胞からのゲノム全領域増幅

本項では、口腔粘膜細胞のライセートまたはゲノムDNAから、GenomiPhiを用いてゲノムDNAを増幅する方法を紹介します。増幅したDNAはPCRやSNP解析・STR解析などのアプリケーションに直接利用することができます。GenomiPhiはさまざまなサンプルからのゲノムDNAを増幅するキットです。キットにはPhi29 DNA polymeraseを用いており、鎖置換法によって指数関数的に一本鎖、あるいは二本鎖の直鎖DNAを増幅します。一定温度で一晩の反応でわずか1 ngのDNAからマイクログラムオーダーのDNAが増幅されます。また、増幅されたDNAの多くは10 kb以上の長さで、Phi29 DNA polymeraseの校正活性により鋳型DNAの配列を忠実に保存しながら増幅します。そこで、GenomiPhiによって増幅したDNAは、ゲノムDNAと同様のアプリケーションに用いることができます。

使用した製品

☐ GenomiPhi DNA Amplification Kit	25-6600-01
☐ Typhoonバリアブルイメージアナライザー	
☐ Taq DNA Polymerase	27-0798-04
☐ dNTPs (各100 mM)	27-2035-01
☐ 100 Base-Pair Ladder	27-4007-01
☐ KiloBase DNA Marker	27-4004-01

他に必要な試薬・機器

- ☐ 綿製、あるいはポリエステル製のアプリケーター
- ☐ アルカリ溶液：
400 mM KOH、100 mM DTT、10 mM EDTA
- ☐ 中和溶液：
400 mM HCl、600 mM Tris-HCl、pH0.6 (1 M HCl
4 mlと1 M Tris-HCl (pH7.5) 6 mlを混ぜて調製)
- ☐ サーマルサイ클ラー
- ☐ PBSバッファー
- ☐ PCR用ヌクレオチドミックス
- ☐ SYBR Gold nucleic acid gel stain
(Molecular Probes)
- ☐ アガロースゲル
- ☐ ヒトプロスタグランジンEレセプターEP3サブタイプ
(PTGER3) 用プライマー
- ☐ PicoGreen dsDNA Quantitation Kit
(Molecular Probes)
- ☐ TEバッファー

プロトコール

初めに綿あるいはポリエステル製のアプリケーターを使って口腔粘膜細胞を集めます。集めた細胞から市販の抽出キットやアルカリ・中和溶液を用いて部分精製し、このライセート1 µlまたは最終精製したゲノムDNA 2 ngから増幅します。増幅DNAはPicoGreenを用いて定量し、また0.8% アガロースゲル電気泳動で確認します (図5-1)。

A. 口腔粘膜細胞からのライセート調製

- 1) 清潔なハサミでアプリケーターの軸を切り、1.5 mlの遠心チューブ内に細胞が付着したブラシ部分を入れます。
- 2) 400 µlの1×PBSバッファーを各チューブに加えて、よく混ぜます。
- 3) 400 µlのアルカリ溶液を加えて、ボルテックスを使って軽く混ぜます。氷上で10分間静置します。
- 4) 400 µlの中和溶液を加えて、チューブを指でタッピングして混和します。

B. DNA増幅

ポイント

反応サンプルはPhi29 DNA polymeraseの非特異的な酵素活性を抑えるために氷上で調製する必要があります。

オプション1

コントロールDNAとして、精製したゲノムDNAをTEバッファーで1 ng / µlに希釈して使用してください。

- 1) 新しいチューブに9 µlのSample bufferを入れ、ステップA.の4) で得た1 µlのライセートを加えます。

オプション2

新しいチューブに9 µlのSample bufferを入れ、オプション1で得た1 µlのコントロールDNAを加えます。

- 2) 95℃で3分間熱変性させてから、氷上に静置して4℃に冷却します。

ポイント

DNAにニックが入る原因になるので、熱変性は3分以上行わないでください。

- 3) 各チューブに9 µlのReaction bufferと1 µlのEnzyme mixを加えます。

ポイント

Reaction bufferとEnzyme mixは、マスターミックスとして調製することも可能です。マスターミックスの調製は使用する直前に行ってください。

- 4) 30℃で16～18時間インキュベートします。
- 5) Phi29 DNA polymeraseの持つエキソヌクレアーゼ活性でDNAが分解されないように65℃で10分間熱処理し、酵素を失活させます。
- 6) -20℃で増幅DNAを保存します。長期間保存する場合は適量のTEバッファーでサンプルを希釈します。

C. ヒト第一染色体のPTGER3遺伝子座位のPCR増幅

GenomiPhiで調製したDNAサンプルと精製したゲノムDNAは、ヒトの第一染色体に存在するプロスタグランジンEレセプターEP3サブタイプ (PTGER3) 遺伝子のPCR増幅の鋳型として用いることができます。

ポイント

本実験では、表5-1に示したPCR条件により各サンプル1 µlからPTGER3遺伝子を増幅しました。以下に示すサイクルで反応を行いました。

表5-1. PCRの反応液組成および反応条件

Components	Volume (µl)
10× PCR buffer	2.5
dNTP mix (各2.5 mM)	2.0
Primer (forward; 20 µM)	1.0
Primer (reverse; 20 µM)	1.0
Taq Polymerase (5 U / µl)	0.25
DNA, PBS, or water	x
water	to 25

95℃ 3分
↓
95℃ 30秒
56℃ 30秒
72℃ 45秒
↓
72℃ 2分

×40

各PCR産物 5 µlを使ってSYBR Gold色素を含んだ2 %アガロースゲルでマーカーと同時に電気泳動を行いました。Typhoonバリアブルイメージアナライザーを用い、526 nmで検出してゲルイメージを得ました (図5-1)。

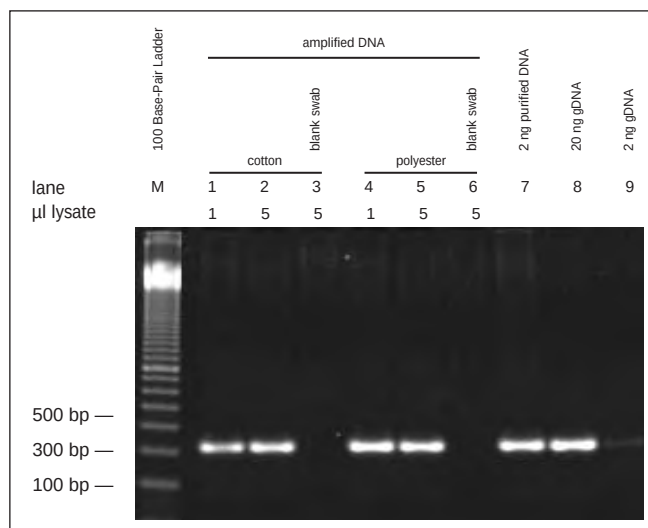


図5-1. ヒト第一染色体のPTGER3遺伝子座位由来のPCR増幅DNAのアガロースゲル電気泳動

結果

口腔粘膜細胞ライセートから、簡便なアルカリ溶解法を用いた後にGenomiPhiで効率良くゲノムDNAが増幅され、また、PCR実験ではPTGER3遺伝子座位から予想される328 bpの増幅DNAが検出されました (図5-2)。一方、細胞の付着していなかったブランクのswabからもバックグラウンドの増幅が認められましたが (図5-2のレーン4、8、14、18)、この増幅DNAからは遺伝子特異的なPCR産物は認められませんでした (図5-1のレーン3、6)。

結論

GenomiPhiでは口腔粘膜細胞からゲノムDNAを簡単に増幅できます。一般的なswabアプリケーションであれば増幅に用いることができます。GenomiPhiを使う際には口腔粘膜細胞サンプルからDNAを精製する必要はありません。増幅したDNAサンプルは、さらに精製せずにPCRに直接用いることができます。

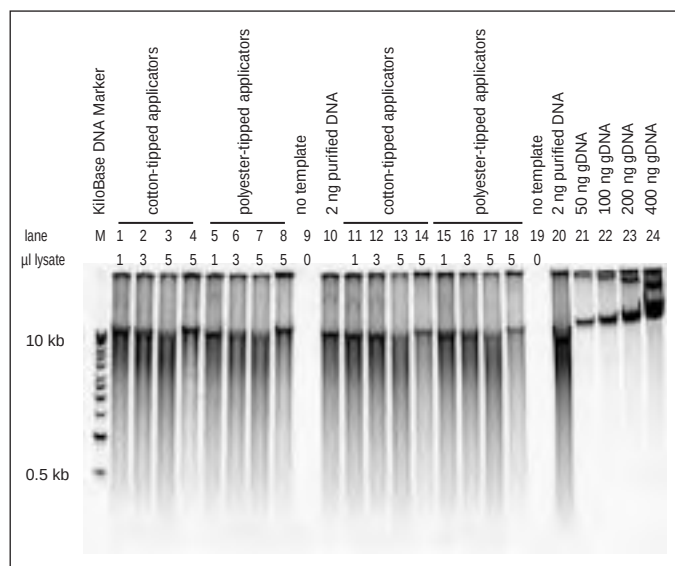


図5-2. 口腔粘膜細胞からGenomiPhi増幅したDNAのアガロースゲル電気泳動

5.2 簡易抽出血液ライセートからのゲノム全領域増幅

血液は遺伝子解析に使用するゲノムDNAの一般的な供給源ですが、血液からのゲノムDNAの抽出・精製には複雑な操作が必要となります。本項では、全血からゲノムDNAを簡易抽出し、GenomiPhiを用いて増幅したDNAをPCRの鋳型として用いる簡便な方法を紹介します。この方法ではヘパリン、EDTA、クエン酸塩のような一般的な抗凝血剤が含まれていても使用可能です。

使用した製品

☐ GenomiPhi DNA Amplification Kit	25-6600-01
☐ Typhoonバリアブルイメージアナライザー	
☐ Taq DNA Polymerase	27-0798-04
☐ dNTPs (各100 mM)	27-2035-01
☐ 100 Base-Pair Ladder	27-4007-01
☐ KiloBase DNA Marker	27-4004-01

他に必要な試薬・機器

- ☐ BDバキュトレーナー血液回収チューブ (Becton Dickinson & Company)
- ☐ PBSバッファー
- ☐ QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen)
- ☐ アルカリ溶液：
400 mM KOH、100 mM DTT、10 mM EDTA
- ☐ 中和溶液：
400 mM HCl、600 mM Tris-HCl、pH0.6 (1 M HCl
4 mlと1 M Tris-HCl (pH7.5) 6 mlを混ぜて調製)
- ☐ 微量高速遠心機
- ☐ ヒトプロスタグランジンEレセプターEP3サブタイプ
(PTGER3) 用プライマー
- ☐ SYBR Gold nucleic acid gel stain
(Molecular Probes)
- ☐ アガロースゲル
- ☐ ヒーティングブロック
- ☐ サーマルサイクラー
- ☐ TEバッファー
- ☐ コントロール用DNA

プロトコール

A. 全血からの簡易抽出法

- 20 μ lの全血が入った1.5 ml遠心チューブに40 μ lの1×PBSバッファーを加えます。チューブを反転させて穏やかに混和します。

ポイント

この方法はヘパリン、EDTA、クエン酸塩のような抗凝血剤を含んだ血液で評価しました。ヘムのような生体分子はPhi29 DNA polymeraseの酵素活性を阻害するので、簡易抽出したサンプルは増幅前に十分に希釈する必要があります。血液成分は個々に異なりますので、使用する全血量はあらかじめ至適条件を検討する必要があります。希釈液量は最終的には60 μ lにしてください。なお、全血量が10 μ l以下の場合には、DNA量が十分回収できないのでおすすめしません。

- 60 μ lのアルカリ溶液を加えて、ボルテックスを使って軽く混ぜます。氷上に10分間静置します。
- 60 μ lの中和溶液を加えて、チューブの上下を反転させてよく混ぜます。最終液量は180 μ lになります。ライセートは増幅反応にすぐに使用できます。

B. DNA増幅

ポイント

反応サンプルはPhi29 DNA polymeraseの非特異的な酵素活性を抑えるために氷上で調製する必要があります。

オプション

コントロールDNAとして、精製したゲノムDNAをTEバッファーで1 ng / μ lに希釈して使用してください。

- 新しいチューブに9 μ lのSample bufferを入れ、ステップA.の3) で得た1 μ lのライセート (または1 μ lのコントロールDNA) を加えます。

オプション

過剰の塩で増幅反応が阻害される可能性がありますので、加えるライセート量は1 μ lを超えないようにしてください。

- 95°Cで3分間熱変性させてから氷上に静置して4°Cに冷却します。

ポイント

DNAにニックが入る原因になるので、熱変性は3分以上行わないでください。

- 各チューブに9 μ lのReaction bufferと1 μ lのEnzyme mixを加えます。

ポイント

Reaction bufferとEnzyme mixは、マスターミックスとして調製することも可能です。マスターミックスの調製は使用する直前に行ってください。

- 4) 30℃で16～18時間インキュベートします。
- 5) Phi29 DNA polymeraseの持つエキソヌクレアーゼ活性でDNAが分解されることを防ぐためにサンプルを65℃、10分間熱処理し、酵素を失活させます。
- 6) 増幅DNAをアプリケーションにすぐに使用します。または適量のTEバッファーで希釈して-20℃で保存します。

C. PTGER3遺伝子座位のPCR増幅

血液ライセートからGenomiPhi増幅したDNAをPCRの鋳型として用い、その特性を検証しました。本実験では、ヒト第一染色体上に存在するプロスタグランジンEレセプターEP3サブタイプ (PTGER3) 遺伝子座位を特異的に増幅するプライマーを設定し、PCRを行いました。

前述のプロトコールに従って、ヘパリン、EDTA、クエン酸塩の入った全血10、30、50 µlから血液ライセートを調製しました。また、PCR用のコントロールとして用いるためにQIAamp Kitなどを使った一般的な精製方法に従ってDNAを直接精製しました。PCRの鋳型として用いるDNAは1 µlまたは5 µlの各ライセートからGenomiPhi増幅しました。そして、表5-2に示したPCR条件に従って各DNAからPTGER3遺伝子座位を増幅しました。コントロールとして各血液サンプルから精製したゲノムDNA 10 ngも用いました。

表5-2. PCRの反応液組成および反応条件

Components	Volume (µl)
10× PCR buffer	2.5
dNTP mix (2.5 mM ea.)	2.0
Primer (forward; 20 µM)	1.0
Primer (reverse; 20 µM)	1.0
Taq Polymerase (5 U / µl)	0.25
DNA, PBS, or water	x
water	to 25

```

95°C   3分
↓
95°C   30秒
56°C   30秒
72°C   45秒
↓
72°C   2分
  
```

×40

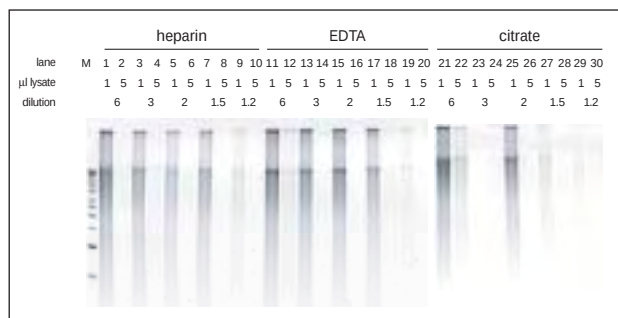


図5-3. 血液ライセートからGenomiPhiによる増幅DNAの0.8% アガロースゲル電気泳動

レーン1～10: ヘパリン含有血液
 レーン11～20: EDTA含有血液
 レーン21～30: クエン酸塩含有血液
 レーンM: KiloBase DNA Marker
 PBSバッファーで希釈後、1 µlまたは5 µlの血液ライセートを増幅に使用しました。

各PCR産物 5 µlを使ってSYBR Gold色素の含んだ2 %アガロースゲルで電気泳動を行いました。ゲルイメージはTyphoonバリアブルイメージアナライザーを用い、526 nmでスキャンして得ました (図5-4)。

結果

血液からアルカリを用いた簡易抽出により得たサンプルを鋳型としてGenomiPhiでゲノムDNAを効率良く増幅できました (図5-3)。抗凝血剤が存在しても増幅効率に影響はありませんでした。使用した血液量が多いと、より多くのヘム分子を含んでいるので増幅反応が阻害され、結果として効率が下がりました。ブランク反応においてもDNAが増幅されていましたが (データ未掲載)、遺伝子特異的なPCR産物は何も得られませんでした (図5-4のレーン10～12)。

PCR実験では、GenomiPhi増幅DNAが3種類のどの抗凝血剤を含んだ血液由来のものであっても、PTGER3遺伝子座位から予想される328 bpの増幅DNAが得られました (図5-4)。一方、PBSバッファーで洗浄したブランクのGenomiPhi増幅DNAからは、何のPCR産物も得られませんでした。

ヘパリンやEDTAを含んだ血液10 µlを血液ライセートの調製に用いた場合、PCR産物は低収量でしたが、これは増幅反応時に十分なDNA量がなかったことによります。ヘパリンやEDTAを含んだ血液ライセートから十分に増幅させるためにはヒトゲノムDNAを最低1 ng用いてください。一方、同じ量でもクエン酸塩を含んだ血液での収率は異なるため、ライセートを調製するために用いる血液量を至適化する必要があります。

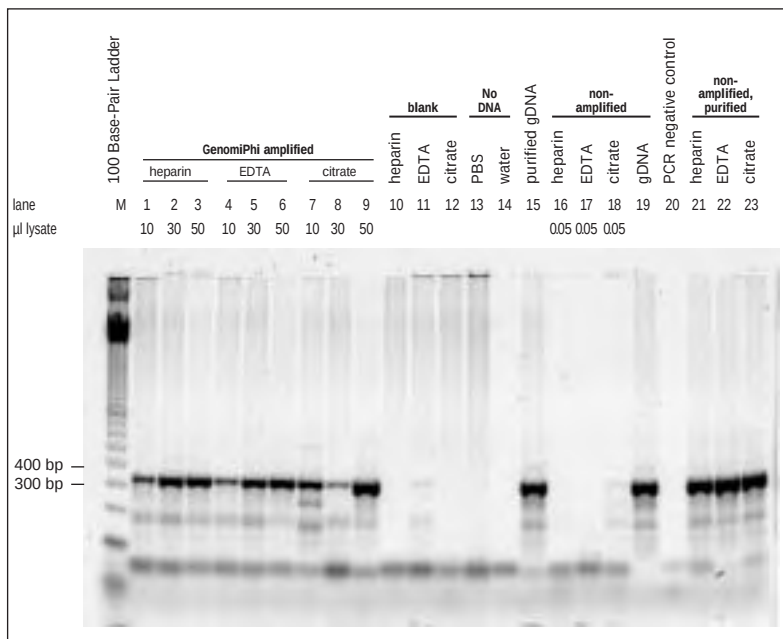


図5-4. ヒト第一染色体上のPTGER3遺伝子座位由来のPCR増幅DNAのアガロースゲル電気泳動解析

結論

簡易抽出した血液ライセートからのゲノムDNA増幅にGenomiPhiを利用するメリットとして、以下の点があります。

- 血液サンプルからDNAを完全に精製する必要がありません。
- わずか10 µlの血液からGenomiPhi反応用サンプル（20 µl 反応系）として180回分が調製できます。
- さまざまな抗凝血剤を含んだBDバキュトレナーからの血液サンプルに使用できます。
- 増幅DNAサンプルはさらに精製を行わなくてもPCRにそのまま使用できます。
- オリジナルのDNA配列は保持されています。

5.3 Blood Cardからのゲノム全領域増幅

Blood Cardは新生児から少量の血液サンプルを採取する場合や、室温で長期間サンプルを保管する場合に便利なツールですが、このCardから回収できるゲノムDNA量は限られているため、大規模な遺伝子解析を行うためには、血液サンプルを追加で採取する必要があります。本項では、GenomiPhiを用いてBlood CardからDNAを増幅するための簡便な方法を紹介します。この方法により遺伝子解析に直接使うことのできる高分子量DNAを増幅することができます。

使用した製品

☐ GenomiPhi DNA Amplification Kit	25-6600-01
☐ Typhoonバリアブルイメージアナライザー	
☐ dNTPs (各100 mM)	27-2035-01
☐ Taq DNA Polymerase	27-0798-04
☐ KiloBase DNA Marker	27-4004-01

他に必要な試薬・機器

- ☐ 903 Specimen Collection Paper (Schleicher & Schuell Bioscience)
- ☐ IsoCode Stix Card (Schleicher & Schuell Bioscience)
- ☐ FTA Card (Waaan Bioscience)
- ☐ TA Purification Reagent (Waaan Bioscience)
- ☐ Chelex 100 Chelating Ion Exchange Resin (BioRad Laboratories)
- ☐ QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen)
- ☐ アルカリ溶液：
400 mM KOH、100 mM DTT、10 mM EDTA
- ☐ 中和溶液：
400 mM HCl、600 mM Tris-HCl、pH 0.6 (1 M HCl 4 mlと1M Tris-HCl (pH 7.5) 6 mlを混ぜて調製)
- ☐ 微量高速遠心機
- ☐ SYBR Gold nucleic acid gel stain (Molecular Probes)
- ☐ PicoGreen dsDNA Quantitation Kit (Molecular Probes)
- ☐ ヒトプロスタグランジンEレセプターEP3サブタイプ (PTGER3) 用プライマー
- ☐ アガロースゲル
- ☐ ヒーティングブロック
- ☐ サーマルサイクラー
- ☐ TEバッファー

プロトコール

一般的に使用されているCardを用いて血液サンプルからDNAを調製しました。

A. DNA抽出

① Guthrie CardからのDNA抽出

- 1) Guthrie Cardから血液の染み込んだ部分を打ち抜き (直径約3 mm)、1.5 ml遠心チューブに入れます。
- 2) 1 mlの滅菌水を加え、室温で15～30分間インキュベートします。ディスクから細胞を取り除くために、時々チューブを反転して混和します。
- 3) 微量高速遠心機で15,000 rpmで2～3分間遠心し、950 μ l程度の上清を除きます。ペレットを乱さないように注意してください。
- 4) 製品添付のプロトコールに従って水で5% Chelex 100 Resin懸濁液を作製します。懸濁液をよく混ぜてから、すぐにディスクの入っているチューブへ150 μ l移します。
- 5) 56°Cで20分間インキュベートします。時々チューブの底を指でタッピングして混和します。

ポイント

DNAの損傷を避けるために56°Cよりも高温でのインキュベーションや、ボルテックスは避けてください。

- 6) 15,000 rpmで2～3分間遠心します。上清は薄い黄色に着色しています。

② FTA CardからのDNA抽出

- 1) FTA Cardから血液の染み込んだ部分を打ち抜き (直径約3 mm)、1.5 ml遠心チューブに入れます。
- 2) 製品添付のプロトコールに従ってFTA Purification Reagentで洗浄します。各洗浄には1 ml使用したのちディスクを乾燥します。
- 3) 100 μ lのアルカリ溶液を加えて、チューブを数回反転して混和します。

- 4) 氷上で10分間静置します。
- 5) 100 μ lの中和溶液を加えて、チューブを数回反転して混和します。

③ IsoCode Stix CardからのDNA抽出

- 1) 血液の染み込んだIsoCode Stix Cardを1.5 mlの遠心チューブに入れます。
- 2) 500 μ lの滅菌水を加えて、1～2秒間程度で5回ボルテックスにかけます。
- 3) 底にCardを移します。
- 4) 100 μ lの滅菌水をチューブに加えて、Cardが水で完全に覆われるようにします。
- 5) 95°Cで20分間熱処理をします。
- 6) 室温までチューブを冷却し、チューブを反転して混和します (50～60回)。

B. DNA増幅

ポイント

反応サンプルはPhi29 DNA polymeraseの非特異的な酵素活性を抑えるために氷上で調製する必要があります。

- 1) 新しいチューブ、またはプレートに9 μ lのSample bufferとステップAで調製した1 μ lのDNA溶液を加えます。
- 2) 95°Cで3分間、熱変性させてから氷上に静置して4°Cに冷却します。

ポイント

DNAにニックが入る原因になるので、熱変性は3分以上行わないでください。

- 3) 各チューブに9 μ lのReaction bufferと1 μ lのEnzyme mixを加えます。

ポイント

Reaction bufferとEnzyme mixは、マスターミックスとして調製することも可能です。マスターミックスの調製は使用する直前に行ってください。

- 4) 30°Cで16～18時間インキュベートします。
- 5) Phi29 DNA polymeraseのもつエキソヌクレアーゼ活性でDNAが分解されることを防ぐためにサンプルを65°C、10分間の熱処理し、酵素を失活させます。
- 6) -20°Cで増幅DNAを保存します。長期間保存する場合は適量のTEバッファーでサンプルを希釈します。

ヒト第一染色体のPTGER3遺伝子座位のPCR増幅

Blood CardからGenomiPhi増幅したDNAをPCRの鋳型として使い、その特性を検証しました。本実験では、ヒト第一染色体上に存在するプロスタグランジンEレセプターEP3サブタイプ (PTGER3) 遺伝子座位を特異的に増幅するプライマーを設定し、PCRを行いました。

ポイント

本実験では、抗凝血剤 (ヘパリン、クエン酸塩、EDTA) を含んだ血液を固定したGuthrie Cardを使用しています。PicoGreen試薬をGenomiPhi反応でのDNA収量を測定するために使用しました。ゲノムDNAはQIAamp Kitを使って全血サンプルから直接精製しました。

表5-3で示したPCR条件に従って各サンプルからPTGER3遺伝子座位を増幅しました。コントロールとして各血液サンプルから精製したゲノムDNA 10 ngも用いました。

表5-3. PCRの反応液組成および反応条件

Components	Volume (μ l)
10 $\times$ PCR buffer	2.5
dNTP mix (各2.5 mM)	2.0
Primer (forward; 20 μ M)	1.0
Primer (reverse; 20 μ M)	1.0
Taq Polymerase (5 U / μ l)	0.25
DNA, PBS, and water	x
Water	to 25

95°C	3分	] ×40
↓		
95°C	30秒	
56°C	30秒	
72°C	45秒	
↓		
72°C	2分	

各PCR産物5 μ lをSYBR Gold色素の含んだ2 %アガロースゲルで電気泳動を行いました。ゲルイメージはTyphoonバリアブルイメージアナライザーを用いて526 nmで検出しました (図5-5)。

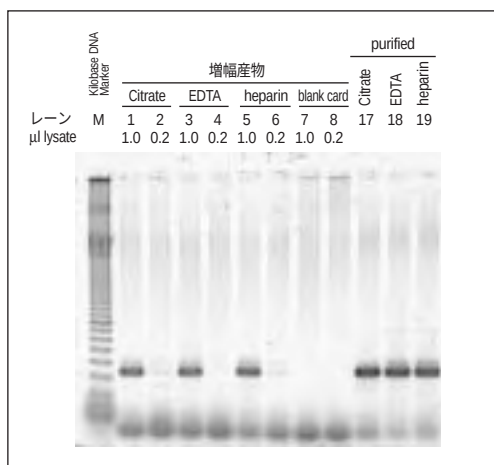


図5-5. ヒト第一染色体上のPTGER3遺伝子座位由来のPCR増幅DNAのアガロースゲル電気泳動

1 μlまたは0.2 μlのBlood Cardライセート由来のDNAを使用しました。

結果

Cardから簡便なアルカリ溶解法でDNAを抽出し、GenomiPhiを用いて、4 μg以上のDNAが効率良く増幅できました。ブランクのCardからバックグラウンド増幅が起きましたが（図5-6のレーン13～16）、遺伝子特異的なPCR産物は検出されませんでした（図5-5のレーン7～8）。

PCR実験では3種類のどの抗凝固剤を含んだサンプルでも、1 μlのライセートからPTGER3遺伝子座位から予想される328 bpの増幅DNAが得られました（図5-5）。しかし、0.2 μlのライセートからはPCR産物は検出されませんでした。これはBlood Cardライセート0.2 μlの中にはGenomiPhiでゲノムDNAを増幅するのに十分なDNA量が含まれていなかったことによると考えられます。

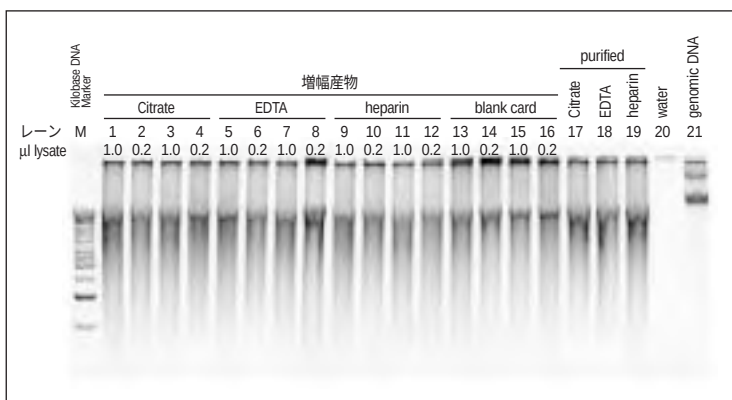


図5-6. Guthrie Card (903 Specimen Collection Paper) からのGenomiPhi増幅DNAの0.7% アガロースゲル電気泳動

1 μlまたは0.2 μlのBlood CardライセートをGenomiPhi増幅に使用しました。

結論

Cardに染み込んだ血液からのゲノムDNA増幅にGenomiPhiを利用するメリットとして、以下の点があります。

- 血液サンプルからDNAを完全に精製する必要がありません。
- この方法は抗凝固剤の入った血液サンプルにも適用することができます。
- 増幅DNAを精製せずにPCRに使用できます。
- オリジナルのDNA配列は保存されています。

5.4 増幅DNAを鋳型としたPCR

GenomiPhi増幅DNAは数多くの遺伝子解析アプリケーションに用いることができます。その中でも、PCRによる特異的なフラグメントの増幅はゲノム解析をする上で基本となる手法です。本項ではGenomiPhi増幅DNAがPCRの鋳型として使えることを示した実験例を紹介します。

本実験では同量のGenomiPhi増幅DNAとゲノムDNAを鋳型に用いてPCRによる比較を行いました。GenomiPhi増幅DNAは未精製のまま用い、PCRの効率を調べるためにMGB Eclipse real-time PCR probeにてreal-time PCRを行いました。この試薬はMGBテクノロジー、Eclipse Dark Quencherや特別に修飾された塩基などを使うことにより高性能で高感度な解析ができます。

使用した製品

- | | |
|--|------------|
| ☐ GenomiPhi DNA Amplification Kit | 25-6600-01 |
| ☐ DNA Polymerization Mix | 27-2094-02 |

その他に必要な試薬・機器

- ☐ MGB Eclipse Probes (Epoch Biosciences)
- ☐ ABI PRISM 7700 Sequencing Detection System (Applied Biosystems)
- ☐ ABI PRISM 7900 HT (Applied Biosystems)
- ☐ JumpStart *Taq* DNA ポリメラーゼ (Sigma-Aldrich)
- ☐ PicoGreen dsDNA Quantitation Kit (Molecular Probes)
- ☐ ヒト由来ゲノムDNA, G1521 と G1471 (Promega)
- ☐ ヒト由来ゲノムDNA, code NA 14660 (Coriell Institute for Medical Research)
- ☐ TEバッファー

プロトコール

ここではMGB Eclipse Probeを使用したreal-time PCRにて7種類の染色体から8箇所の遺伝子座位を確認する際のプロトコールの詳細を記載しています。

A. DNAの増幅

ポイント

Phi29 DNA polymeraseの非特異的な反応を防ぐために調製は氷上で行なってください。

- 1) 9 μ lのSample bufferに1 μ lのヒトゲノムDNA (1 ng / μ l)を加えます。
- 2) 95°Cにて3分間熱変性を行ない、氷上で4°Cまで急冷します。

ポイント

DNAにニックが入る原因になるので、熱変性は3分以上行わないでください。

- 3) 9 μ lのReaction bufferと1 μ lのEnzyme mixを加えピペティングにて混和します。

ポイント

Reaction bufferとEnzyme mixは、マスターミックスとして調製することも可能です。マスターミックスの調製は使用する直前に行ってください。

- 4) 30°Cで16~18時間インキュベートします。

- 5) 65°Cで10分間インキュベートすることにより酵素を熱失活させます。熱失活により Phi29 DNA polymeraseのエキソヌクレアーゼによるDNAの分解を防ぐことができます。熱失活を行なった後は4°Cもしくは-20°Cにて保存します。

ポイント

通常4~7 µgの増幅DNAが得られます。PicoGreenを用いてDNA定量することをおすすめします。

B. GenomiPhi増幅DNAとゲノムDNAを鋳型とした real-time PCR

- 1) TEバッファーにて GenomiPhi増幅DNAとゲノムDNAの両方を21.3 ng/mlに希釈し、さらに段階的に10倍ずつ最終濃度2.13 pg/mlまで希釈します。
- 2) それぞれ希釈した GenomiPhi増幅DNAとゲノムDNA溶液から362、36.2、3.62、0.362、0.0362 ngの5種類の希釈系列のDNAを用いて real-time PCRを行います。

ポイント

ヒトゲノムDNAでこれら5種類のDNA量はゲノム上ハプロイドコピー数の10⁵、10⁴、10³、10²、10¹個に相当します。

- 3) 表5-4に記載されている量のPCR用試薬をオプティカルPCRチューブに用意します。
- 4) ABI PRISM 7700もしくは7900にて表5-4に示した条件で real-time PCRを行います。

表5-4. real-time PCRの反応液組成および反応条件

Components	Stock concentration	Volume (µl)
Eclipse Hybridization Buffer	10×	2.5
dNTPs mix	各20 mM	0.5
JumpStart Taq polymerase	2.5 units / µl	0.4
primer mix	20×	1.25
MGB Eclipse Probe	20×	1.25
water	N/A	2.1
DNA template	N/A	17
Total volume		25

95°C	3分	
↓		
95°C	30秒	] × 40
56°C	30秒	
72°C	45秒	
↓		
72°C	2分	

結果

7つの染色体上の8箇所の遺伝子座位はランダムに選びました（表5-5）。それぞれの遺伝子座位についてプライマー及びMGB ProbeをEpoch Biosciencesの専用ソフトウェアにて設計しました。real-time PCRによるそれぞれのデータ比較は図5-7、5-8にまとめています。それぞれの遺伝子座位のコピー数は、鋳型DNAの質量とThreshold Cycle Value (Ct) を元にして計算しています。8箇所の遺伝子座位それぞれのコピー数は図5-9、5-10にまとめています。

表5-5. real-time PCRで調べた遺伝子

Gene Name	Locus
Flavin-containing mono-oxygenase 3	1q24.3
Intergrin beta-6 precursor	2q24.2
Collagen alpha 3 (VI) chain precursor	2q37.3
Estrogen receptor	6q25.1
Actin, cytoplasmic 1	7p22.1
Glycine dehydrogenase	9p24.1
L-Lactate dehydrogenase a chain	11p15.1
Collagen alpha 3 (IX) chain precursor	20q13.33

結論

ヒトゲノムDNAをGenomiPhiにて増幅させ、さまざまな濃度で real-time PCRを行いました。GenomiPhi増幅DNAより得られたデータと増幅前のゲノムDNAから得られたデータとの間で比較を行いました。比較は、PCRにて7つの染色体からランダムに選んだ8箇所の遺伝子座位について行いました。PCRの反応効率に関しては、GenomiPhi増幅DNAは精製を行なわなくても増幅前ゲノムDNAを用いた場合の効率と同等であることがわかりました。また、GenomiPhiのネガティブコントロールに非特異的増幅が確認されましたが、これらの非特異的増幅DNAを用いて8箇所の遺伝子座位に関して同様にPCRを行った結果、増幅は確認されませんでした。このことから、各染色体間の増幅反応によるバイアスは3倍以内に抑えられていることがわかります。

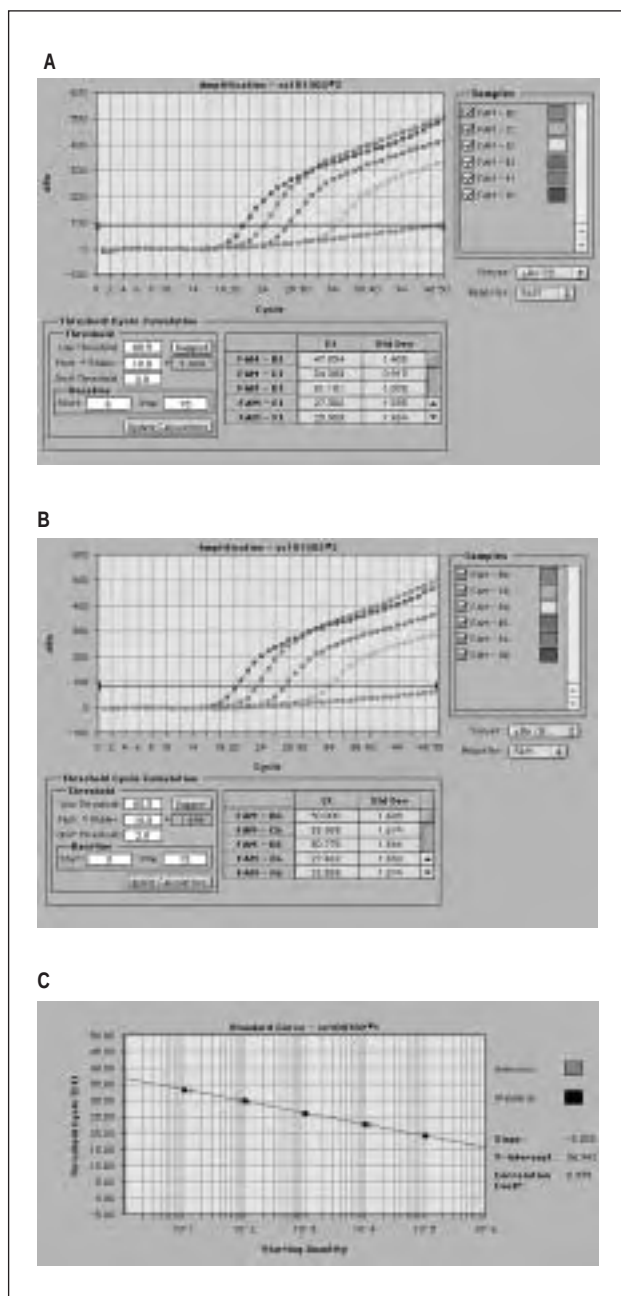


図5-7. 遺伝子座位7p22.1におけるヒトゲノムDNAとGenomiPhi増幅DNAのPCR増幅効率の比較（巻末カラーページ参照）

- A) 男性ヒトゲノムDNA（Promega）の濃度別 real-time PCRデータ
 B) 男性ヒトゲノムDNA（Promega）を鋳型としGenomiPhiにて増幅したDNAを用いたreal-time PCRデータ
 C) 標準曲線
 標準データとしてCoriell製ヒトゲノムDNA（code NA 14660）を用い、黒の点にて示しています。赤の点で示しているデータはヒトゲノムDNA（Coriell社、NA14660）を鋳型としてGenomiPhiにて増幅させたものです。両方のデータはABI PRISM 7700にて解析しました。

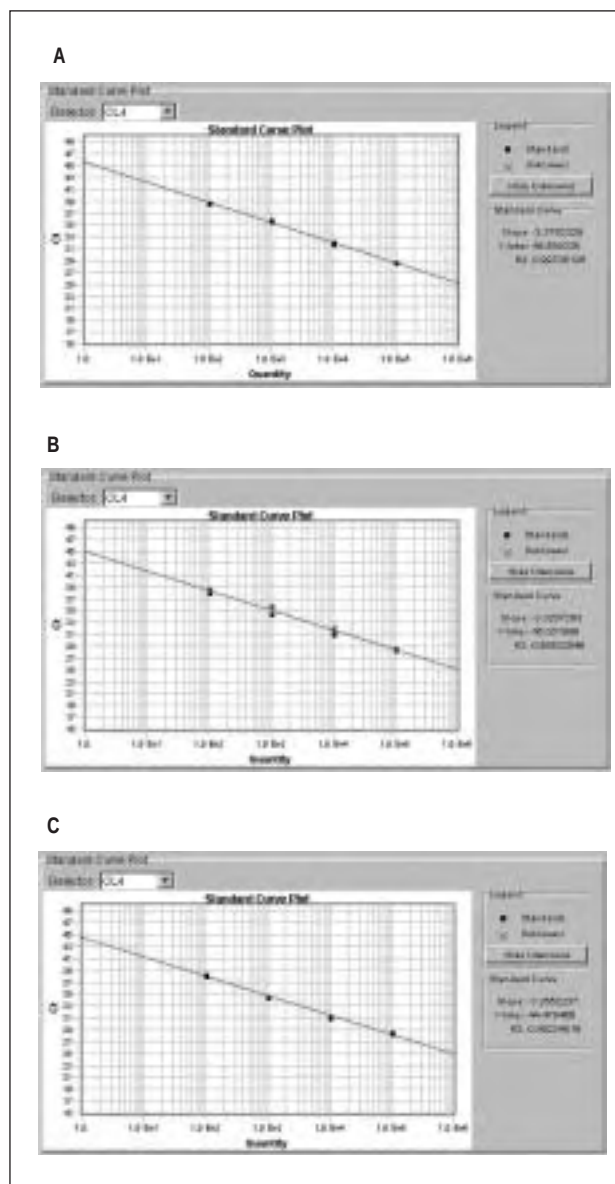


図5-8. 遺伝子座位20q13.33におけるヒトゲノムDNAとGenomiPhi増幅DNAのPCR増幅効率の比較（巻末カラーページ参照）

- A) 女性ヒトゲノムDNAの標準曲線
 B) 女性ヒトゲノムDNAをGenomiPhiにて増幅したものの標準曲線
 C) A) 青点、B) 黒点の比較

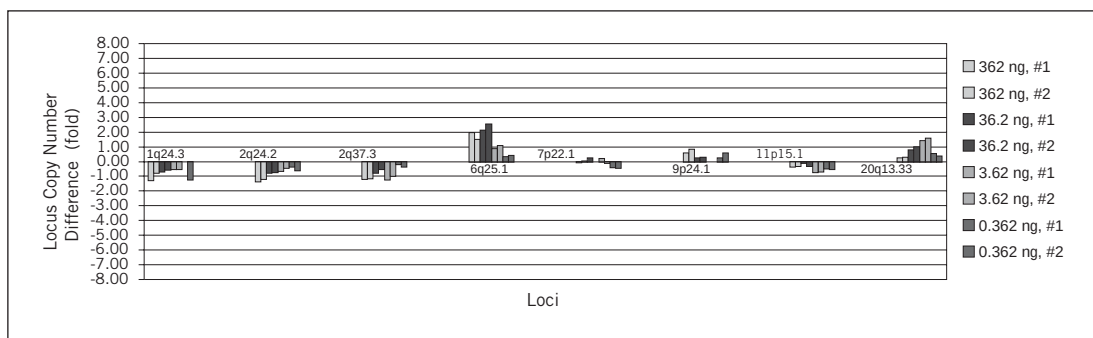


図5-9. ゲノムDNAとGenomiPhi増幅DNAの遺伝子座位のコピー数の比較（巻末カラーページ参照）

real-time PCRでは女性のヒトゲノムDNAとそれを鋳型としてGenomiPhiにて増幅したDNAを使用しました。Threshold Cycle値を元にそれぞれのDNA中の遺伝子座位コピー数（C#）を計算しました。増幅したDNAのC#がゲノムDNAのC#より大きい場合、それぞれの違いは $\left[\frac{\text{増幅したDNAのC\#}}{\text{ゲノムDNAのC\#}} \right] - 1$ で、増幅したDNAのC#がゲノムDNAのC#より小さい場合、それぞれの違いは $1 - \left[\frac{\text{増幅したDNAのC\#}}{\text{ゲノムDNAのC\#}} \right]$ で示されます。

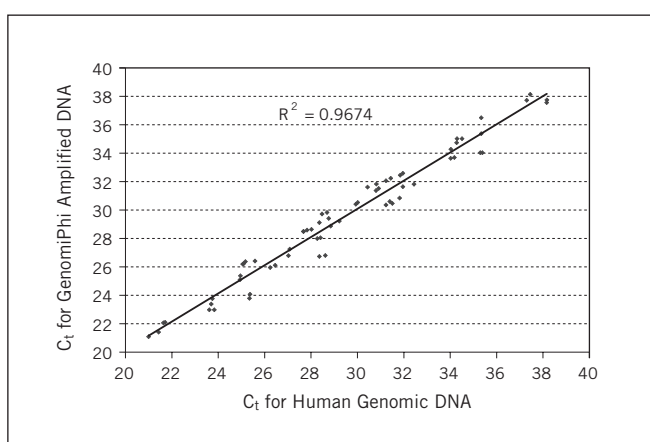


図5-10. GenomiPhi増幅DNAとヒトゲノムDNAのreal-time PCRデータの類似性

8箇所の遺伝子座位に関して調査を行いました。それぞれ鋳型は4種類の濃度について解析しました。各反応はGenomiPhi増幅DNAまたはゲノムDNAを用いてduplicateにて行っています。ここではそれぞれのThreshold Cycle（Ct）値を表記しています。

5.5 multiplex PCR用サンプルとしての増幅DNAの利用

GenomiPhiで増幅したDNAは、多くのアプリケーションにおいてゲノムDNAの代わりに用いることができます。ゲノムDNAを用いる多くの解析は、はじめに特定領域をPCR増幅させるので、PCRの鋳型としてGenomiPhi増幅DNAが使用可能であるか検討しました。未精製のGenomiPhi増幅DNAからのmultiplex PCRは、特に分子量の大きなDNAの増幅効率は良くありませんでしたが、本項ではGenomiPhi増幅DNAの精製方法や、一般的なPCRエンハンサーを加えることでmultiplex PCRが可能になることを紹介します。

使用した製品

☐ GenomiPhi DNA Amplification Kit	25-6600-01
☐ DNA Polymerization Mix	27-2094-02
☐ dNTPs (各100 mM)	27-2035-01
☐ 100 Base-Pair Ladder	27-4007-01

その他に必要な試薬

- ☐ PicoGreen dsDNA Quantitation Kit (Molecular Probes)
- ☐ 10×PCR buffer II、10 mM Tris-HCl pH8.3、50 mM KCl (Applied Biosystems)
- ☐ GeneChip reagent kit (Affymetrix)
- ☐ GeneChip CYP450 primer set (Affymetrix)
- ☐ AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems)
- ☐ ヒトDNA、女性 (Promega)
- ☐ ヒトDNA、男性 (Promega)
- ☐ 10×multiplexバッファー：
10 mM Tris pH8.0、0.1% Tween 20、
37.5 µg / µl BSA

プロトコールーDNA増幅

ポイント

反応サンプルはPhi29 DNA polymeraseの非特異的な酵素活性を抑えるために氷上で調製する必要があります。

- 1) 9 µlのSample bufferに1 µl (10 ng) のヒトゲノムDNAを混合します。
- 2) 95°Cで3分間熱変性させてから氷上に静置して4°Cに冷却します。

ポイント

DNAにニックが入る原因になるので、熱変性は3分以上行わないでください。

- 3) 9 µlのReaction bufferと1 µlのEnzyme mixを加えます。

ポイント

Reaction bufferとEnzyme mixは、マスターミックスとして調製することも可能です。マスターミックスの調製は使用する直前に行ってください。

- 4) 30°Cで16～18時間インキュベートします。
- 5) 65°Cで10分間、熱変性させてから氷上に静置します。
- 6) PicoGreenアッセイ (9ページ参照) によって、増幅収量を測定します。

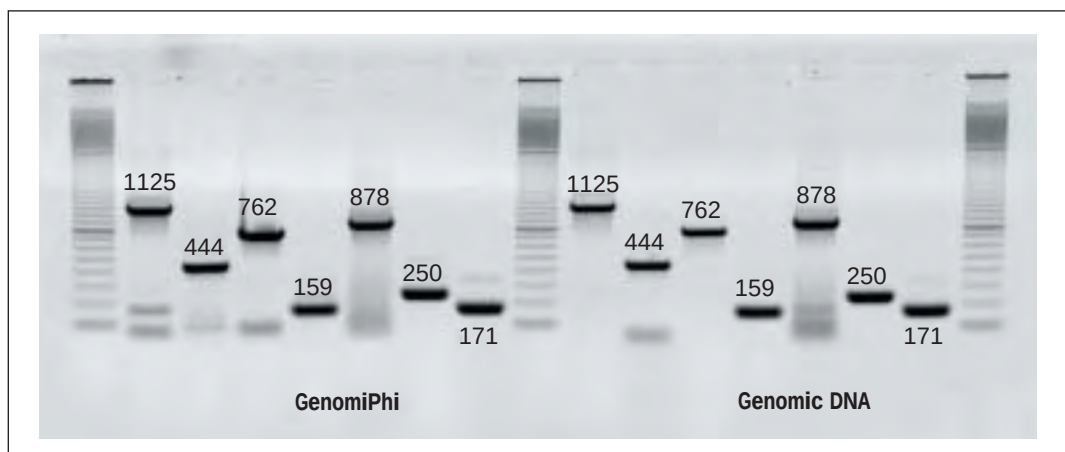


図5-11. GeneChip CYP450 primer setを用いたPCR結果

GenomiPhiで増幅した精製DNAやゲノムDNAを鋳型として7組のprimer setを用いてPCRを行いました。分子量マーカーとして100 bpラダーを用いました。いずれの条件のPCRでも増幅されていることが確認できました。

至適条件の検討

GenomiPhiで増幅したDNAを用いたmultiplex PCRの至適条件の検討方法について説明します。multiplex PCRには、GeneChip CYP450 primer setを用いて7組の反応を行っています。図5-11に示したprimerを以下のmultiplex PCRに使用しました。

① エンハンサー添加による改善

10×multiplexバッファーは10 mM Tris pH8.0、0.1% Tween 20、37.5 µg/µl BSAで構成されています。GenomiPhiで増幅した未精製DNAを使う場合、このバッファーを添加してmultiplex PCRを行うと結果が改善しました（図5-12）。

② Taq polymeraseの増量および増幅DNAの精製による改善

multiplex PCRにおいて、Taq DNA polymeraseの使用量を増やしたり、PCRの前に増幅DNAを精製すると結果が改善しました（図5-13）。

結論

GenomiPhiで増幅したDNAは以下の改良した方法のいずれかを行うことで、ゲノムDNAからmultiplex PCRを行う場合とほぼ同等の結果が得られます。

- PCR反応液にTween 20とBSAを添加します。
- multiplex PCRの際に酵素量を増やします。
- エタノール沈殿等を用いてGenomiPhi増幅DNAを精製します。

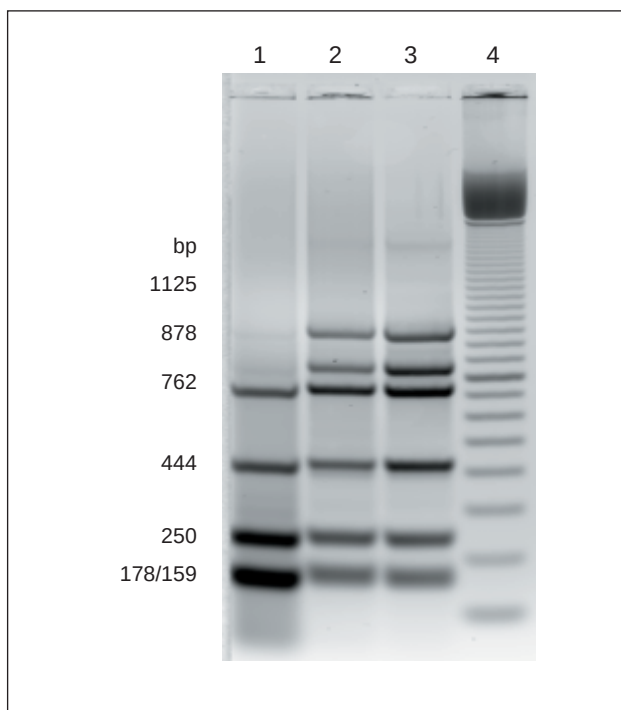


図5-12. GenomiPhi増幅DNAによるmultiplex PCR結果-1

ヒトゲノムDNAおよびGenomiPhi増幅DNAを鋳型としてmultiplex PCRを行いました。レーン1において、1,125 bpと878 bpのPCR産物はほとんど増幅がみられませんでした。レーン2は10×multiplexバッファーを反応に添加した結果です。

- レーン1) 未精製増幅DNA
- レーン2) 未精製増幅DNAにバッファーを添加した場合
- レーン3) ゲノムDNAをバッファー無添加で反応した場合
- レーン4) 100 Base-Pair Ladder

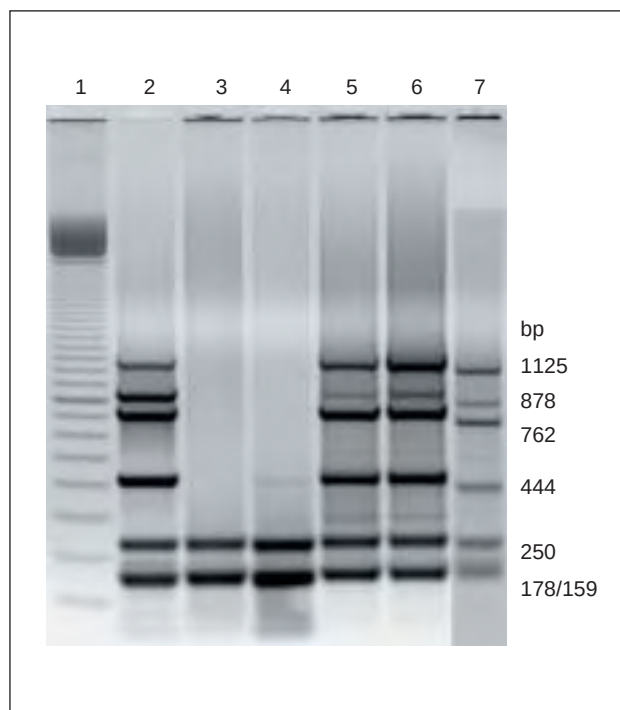


図5-13. GenomiPhi増幅DNAによるmultiplex PCR結果-2

GenomiPhiで増幅したDNAをPCRの前に精製して鋳型にするか、*Taq* polymeraseの使用量を増やすとゲノムDNAを鋳型にした場合と同等の結果が得られました。

- レーン1) 100 Base-Pair Ladder
 - レーン2) ゲノムDNA
 - レーン3) 1× PCR primer
 - レーン4) 2× PCR primer
 - レーン5) 酵素追加 (5 U)
 - レーン6) 酵素追加 (10 U)
 - レーン7) 精製済み増幅DNA
- 未精製

5.6 GeneChip HuSNP Mapping Assayでの GenomiPhi増幅DNAの利用

SNPスコアリングはゲノムDNAの遺伝的変異を解析する手法で、ヒトゲノムの中には多数のSNPが存在します。大規模の解析を行う場合には多量のゲノムDNAが必要となり、サンプルが有限であることが解析を進めるうえでの大きな障害となります。そのため、ゲノムDNAの全ての領域において、オリジナルのDNA配列情報を保持したまま増幅できる有効な技術が必要とされています。

GeneChip HuSNP Mapping Assay Kitは1枚のチップ上で1,494種類のSNP解析ができるマイクロアレイ技術を利用しています。また、鋳型として用いるゲノムDNAからSNP領域を含んだDNA断片を増幅するために、multiplex PCRを行います。オリジナルのゲノムDNAとGenomiPhiで増幅したDNAではその特性が異なるので、multiplex PCRで最適な結果を得るためには、至適条件の検討が必要になる場合があります。

GenomiPhi増幅DNAを用いてGeneChip HuSNP Mapping Assay Kitでの実験を製品添付のプロトコールに従って行くと、非増幅ゲノムDNAを使った場合に比べてSNP判定数とその精度は低い結果となりました。そこで、結果を改善させるために、増幅DNAの精製、multiplex PCRに使用する鋳型DNAの増量、そしてmultiplex PCR時にエンハンサーとなるものを添加するというようなさまざまな改良を試みました。これらの方法全てがSNP判定数や精度の改善に効果を示しました。

使用した製品

- ☐ GenomiPhi DNA Amplification Kit 25-6600-01
- ☐ Tween 20

その他に必要な試薬

- ☐ GeneChip HuSNP Mapping Assay (Affymetrix)
- ☐ CEPH DNA, 884-02 (Coriell Institute for Medical Research)
- ☐ PicoGreen dsDNA Quantitation Kit (Molecular Probes)
- ☐ AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems)
- ☐ エタノール (100%、70%)
- ☐ 酢酸ナトリウム/EDTA溶液：
3.0M 酢酸ナトリウム (pH 8.0以上) と0.5M EDTA (pH 8.0) を等量ずつ混ぜて調製
- ☐ TEバッファ

プロトコール

CEPH DNA (884-02) とTEバッファを使って100 ng/μl、1 ng/μl、10 pg/μlの濃度に調整した3種類のリファレンスDNAサンプルを用意しました。これらのサンプルについて、以下に示したプロトコールに従って増幅、精製、定量を行いました。続いて行うmultiplex PCR、標識反応のためのPCR、GeneChip HuSNP Mapping Assayでのハイブリダイゼーションでは、増幅したサンプルと非増幅コントロールDNAを使用し、比較しました。

A. DNA増幅

ポイント

反応サンプルはPhi29 DNA polymeraseの非特異的な酵素活性を抑えるために氷上で調製する必要があります。

- 1) 9 μlのSample bufferに1 μlのサンプルDNAを混ぜます。
- 2) 95℃で3分間熱変性させてから氷上に静置して4℃に冷却します。

ポイント

DNAにニックが入る原因になるので、熱変性は3分以上行わないでください。

- 3) 各サンプルに9 μlのReaction bufferと1 μlのEnzyme mixを加え、混和します。

ポイント

Reaction bufferとEnzyme mixは、マスターミックスとして調製することも可能です。マスターミックスの調製は使用する直前に行ってください。

- 4) 30℃で16～18時間インキュベートします。
- 5) 65℃で10分間熱変性させてから氷上に静置して4℃に冷却します。

B. 増幅DNAの精製

- 1) 各チューブまたはウェルに20 µlの滅菌水（増幅反応液と等量）を加えます。
- 2) 各反応液に4 µlの酢酸ナトリウム／EDTA溶液（1/10量）を加え、混和します。
- 3) 100 µlの100%エタノールを加え、混和します。エタノールの最終濃度は70%になります。
- 4) 遠心チューブを室温で15,000 rpm、15分間遠心します。96ウェルプレートや384ウェルプレートの場合は、2,500×g以上で少なくとも30分間遠心します。
- 5) 遠心チューブからアスピレーターを使って上清を取り除きます。プレートの場合はプレートを反転させた短時間の遠心（300×gで1分間）が効果的です。できるだけ多くの上清を取り除きます。
- 6) DNAペレットはなるべく大量の70% エタノールで洗浄することをおすすめします。プレートの場合は室温で3,200×g以上で5分間、遠心チューブの場合は室温で15,000 rpm、1分間遠心します。

ポイント

70% エタノール量は0.5 mlの遠心チューブでは250～500 µl、96ウェルプレートでは100 µl、384ウェルプレートでは50 µlにしてください。

- 7) アスピレーター、またはプレートを反転させた遠心で上清を取り除きます。風乾や真空遠心機で2～5分間真空乾燥を行うことをおすすめします。

ポイント

ペレットを溶解するのが困難になりますので、乾燥させすぎないようにしてください。

- 8) 適当量のヌクレアーゼフリーの水（目安は20 ng/µlでサンプルあたり100～250 µl程度）でペレットを溶解します。

- 9) 製品添付のプロトコール、またはGenomiPhiのプロトコール（9ページ参照）に従って、増幅DNAをPicoGreenを用いて定量します。

C. GeneChip HuSNP Mapping Assay試薬による multiplex PCR

- 1) コントロールとして10 ngの精製したゲノムDNA（4 ng/µl）をPCRの鋳型に使用します。
- 2) 増幅したDNAサンプルにおいては30 ngのDNA（12 ng/µl）をPCRに使用します。製品添付のプロトコールに記載されているPCR試薬の他に、Tween 20とウシ血清アルブミン（BSA）を加えます（表5-6）。

表5-6. PCRの反応液組成

Component	Volume (µl)
10× Buffer II	1.25
25 mM MgCl ₂	2.50
2.5 mM dNTP	2.50
AmpliTaq Gold DNA Polymerase	0.25
10× PCR additive*	1.00
water	0.75
total	8.25

* 10 mM Tris, pH 8.0; 0.1% Tween 20; and 37.5 µg/ml BSA

D. multiplex PCR増幅・PCR標識・ハイブリダイゼーション・染色・スキャンニング

これらのステップについてはGeneChipのマニュアルを参照してください。

E. データ解析

GeneChip HuSNP Mapping Assayの添付書に記載されているSNPタイプに対して、SNP判定数の総数とそれらの精度を比較解析しました。

結果

multiplex PCRの条件を変更すると、GenomiPhiで増幅されたDNAでも非増幅ゲノムDNAの場合と同等の結果が得られました（図5-14）。増幅の際に10 pgのDNA（ゲノムDNA約3コピー）しか加えなかった場合はSNP判定数も精度も低くなりました。最適な結果を得るにはGenomiPhiでの増幅には、最低でも1 ngのゲノムDNAを使用することをおすすめします。

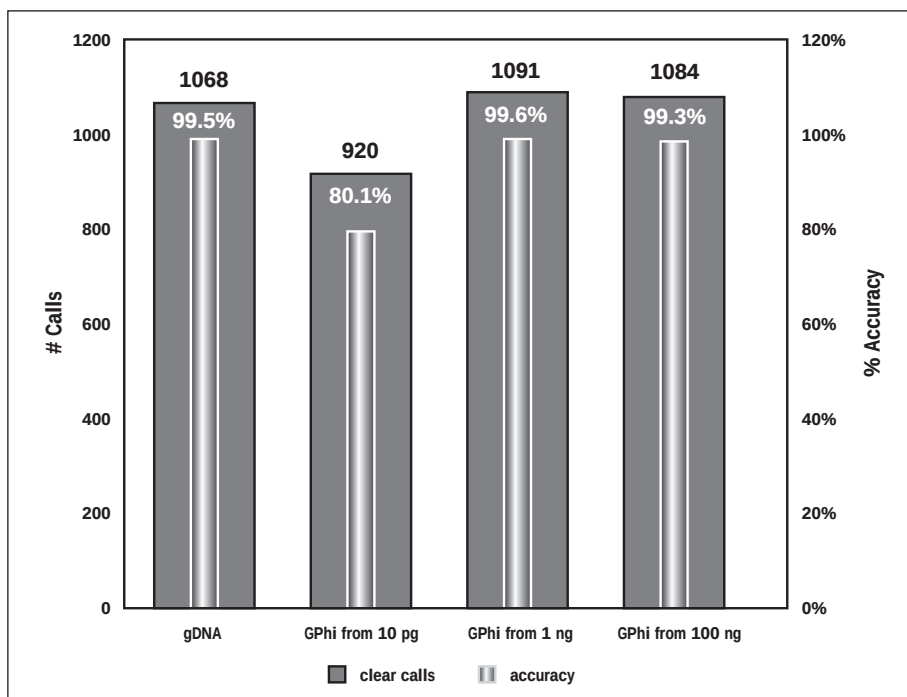


図5-14. GeneChip HuSNP Mapping AssayでのSNPスコアリング

CEPH 884 DNAにおけるSNP判定数とそれらの結果の精度を示しました。実験には10 ngの非増幅ゲノムDNA (gDNA)、またはさまざまなDNA量から増幅を行ったサンプル (GPhi) 30 ngを使用しました。

結論

- GenomiPhiは微量のゲノムDNAを増幅してGeneChip HuSNP Mapping Assayに使用することができます。
- PCRにエンハンサーを添加したり、GenomiPhiでの増幅後に精製してからPCR鋳型量を増やして反応することで、非増幅ゲノムDNAを用いた場合と同等のSNP判定数と精度が得られました。
- 1 ng、または100 ngのゲノムDNAから増幅したサンプル間の結果には違いはありませんでした。

5.7 GenomiPhi 増幅DNAを用いたSTR解析

ごく微量のDNAの増幅は遺伝子解析実験、DNA保存や他のアプリケーションに有用です。GenomiPhiを用いてDNAを増幅する際、鋳型となるDNAは必ずしも完全に精製する必要はありません。たとえば全血、紙に貼り付けた細胞、綿棒に付着させた口腔粘膜細胞などから簡単に溶解操作を行ったサンプルでも十分に増幅反応の鋳型として使用することができます。

Short Tandem Repeat (STR) は遺伝情報の解析手法としてよく用いられています。校正活性を持つPhi 29 DNA polymeraseの使用により増幅したDNAはオリジナルのDNA上の遺伝情報を正確に保存しているので、SNPタイピングやSTR解析などの遺伝子解析に直接使用することが可能です。本項ではGenomiPhiにてヒトゲノムDNAを増幅させ、増幅DNAと増幅前のヒトゲノムDNA上の400箇所のSTR遺伝子座位についての実験プロトコールと解析結果を紹介します。

使用した製品

- ☐ MegaBACE-ET400-Rサイズスタンダード 25-0205-01
- ☐ Tween 20
- ☐ GenomiPhi DNA Amplification Kit 25-6600-01
- ☐ MegaBACE4000 DNA Analysis System

その他に使用する試薬等

- ☐ genotyping loading solution (0.1% [v/v] Tween 20)
- ☐ ABI PRISM Linkage Mapping Set v2.5, 10 cM density (Applied Biosystems)
- ☐ MultiScreen384-SEQ フィルタープレート (Millipore)
- ☐ PicoGreen dsDNA Quantitation Kit (Molecular Probes)
- ☐ CEPH ヒトゲノム DNA #1347 (Coriell Institute for Medical Research)
- ☐ サーマルサイクラー

プロトコール

A. DNAの増幅

ポイント

Phi29 DNA polymeraseの非特異的な反応を防ぐため反応は氷上にて行ってください。

- 1) 9 μ lのSample bufferに1 μ lのヒトゲノムDNA (1 ng / μ l)を加えます。
- 2) 95°Cにて3分間熱変性を行ない、氷上で4°Cまで急冷します。

ポイント

DNAにニックが入る原因になるので、熱変性は3分以上行わないでください。

- 3) 9 μ lのReaction bufferと1 μ lのEnzyme mixを加えピペッティングにて混和します。

ポイント

Reaction bufferとEnzyme mixは、マスターミックスとして調製することも可能です。マスターミックスの調製は使用する直前に行ってください。

- 4) 30°Cで16~18時間インキュベートします。

- 5) 65℃で10分間インキュベートすることにより酵素を熱失活させます。熱失活によりPhi29 DNA polymeraseのエクソヌクレアーゼによるDNAの分解を防ぐことができます。熱失活を行なった後は4℃もしくは-20℃にて保存します。

ポイント

通常4〜7 µgの増幅DNAが得られますが、確認のためPicoGreenを用いて定量することをおすすめします。

B. CEPH DNAの多型解析

GenomiPhiにて増幅したDNA（60 ng）と精製したCEPH DNAを鋳型とし、400箇所のSTR遺伝子座位について多型解析を行いました。使用した試薬はABI PRISM Linkage Mapping Set v2.5で、キットに添付されているマニュアルに従い実験を行いました。PCRで増幅したDNAはMillipore製 MultiScreen 384-SEQを用いて精製し、FAMとVICにてラベルされたフラグメントを20倍に希釈したものをMegaBACE 4000 DNA Analysis Systemにて解析しました（表5-7）。データ解析にはMegaBACE Genetic Profiler v.2.0を使用しました。

表5-7. MegaBACE 4000 DNA Analysis Systemを用いたSTR解析条件

Component	Volume (µl)
Genotyping loading solution	7.75
MegaBACE ET400-R Size Standard	0.25
Desalted STR loci sample	2.00
Final injection volume	10.00

サンプルはインジェクション前に遠心し、95℃で1分間熱変性を行い、氷上で急冷しました。MegaBACEへのインジェクションは3 kVで45秒間行い、泳動は10 kVで75分間行いました。

結果

400箇所のSTR遺伝子座位に関して解析を行い、GenomiPhiにて増幅したDNAとゲノムDNAからは同等の結果が得られました（図5-15）。また全体的な成功率と対立遺伝子の消失数もほぼ同等でした（表5-8）。

表5-8. ヒト由来ゲノムDNAとGenomiPhiにて増幅したDNA間のSTR解析でのデータ比較

サンプル	成功率	対立遺伝子の消失
精製済みヒトゲノムDNA	94%	0.6%
GenomiPhi 増幅ヒトDNA	94%	0.4%

それぞれ3回ずつ解析を行い、その平均値を示しています。STR遺伝子座位はABI Prism Linkage Mapping set v2.5の400個のマーカを用いて増幅し、既知のデータと比較しました。既知のデータではヘテロで、実験結果からホモと判定されたものは対立遺伝子の消失として扱っています。

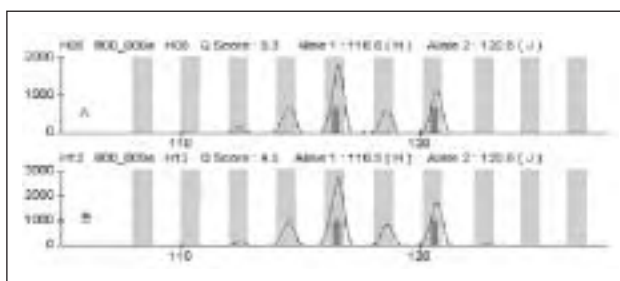


図5-15. ヒトゲノムDNAとGenomiPhiにて増幅したDNA間のSTR解析でのデータ比較

ヒトゲノムDNA（A）とGenomiPhiにて増幅したDNA（B）でSTR解析では同等の結果が得られました。STR解析はMegaBACE4000 DNA Analysis SystemとMegaBACE Genetic Profiler v2.0にて行いました。

結論

GenomiPhiは簡単な操作で微量のゲノムDNAを増幅させることができます。DNAの量は数µgにまで増幅され、その後のさまざまな遺伝子解析に利用可能です。増幅の前後で遺伝情報は正確に保存されているので、STR解析でもゲノムDNAと同等のデータが得られます。今回のデータからは、GenomiPhiを使う手法は特に微量サンプルから遺伝子解析を行いたい場合などに有用であることが示されました。最低1 ng以上の鋳型ゲノムDNAを使用すれば増幅時のバイアスの心配もなく正確な遺伝情報を保存したDNAを増幅することができます。ただし、1 ng以下の量を鋳型とした場合は増幅時にバイアスがかかり増幅が不均一になったり、まったく増幅できないなどの問題が発生する場合があります。

5.8 ゲノムDNA増幅におけるTaq およびPhi29 DNA polymeraseの比較検討

稀少生物の詳細な遺伝学的解析を行うために必要なDNAの確保には、GenomiPhiの利用が有用です。生検にて得られたサンプルや口内洗浄液に由来するサンプルなどのように細胞培養によりDNAを増やすことが難しい、血液サンプルで形質転換に不向き、また重要な遺伝情報を持った培養細胞から必要なDNAを十分量回収できない場合などにGenomiPhiを利用できます。

Coriell Instituteではprimer-extended-preamplification 法（以下PEP）によりゲノムDNAの増幅を行っています。Coriell Instituteでは100歳寿の生検サンプルを扱っており（Coriell Cell Repositories sample-NG15800参照）、細胞培養が難しいため、PEP法を用いて実験に必要十分な量のゲノムDNAを増幅させています。PEP法はdegenerate pentadecamerとTaq polymeraseを使用し、サーマルサイクリングにてバイアスをかけずに鋳型を増幅します。

高い伸長能力、強い鎖置換活性などを特長とするバクテリオファージPhi29のDNA polymeraseを用いたゲノムDNA増幅用のキットGenomiPhiは、熱処理によりDNAを変性し、Phi29 DNA polymeraseの強い鎖置換能力により一定温度で伸長反応を行うことができます。本項ではGenomiPhiとPEP法を比較検討した結果を紹介します。

材料と方法

最初の実験段階として、純度の高いCEPHセルライン（GM06690）を鋳型とし、PEP法とGenomiPhiにて各3回ずつ増幅させました。また少量しか確保できないサンプル、口内洗浄液からのDNAを3検体、200年前の骨からのDNAサンプル2検体、40年間凍結していた血漿からのDNAサンプルを1検体使用しました。LeMarchandの手法により口内洗浄液を調製し、Puregene saltingout法（PureGene Blood Kit, Gentra Systems Minneapolis, MN）にてDNAを抽出しました。同様に血漿からのDNAもPuregene saltingout法にて抽出しました。骨からのDNA調製は、まずカルシウム成分をEDTAにて除き、フェノール抽出しました。コントロールとしてλ DNAを鋳型としてPEPとGenomiPhiで反応を行って増幅を確認し、ヒト特異的プライマーにてPCRを行い、2次増幅が起こらないことを確認しました。またDNAを加えないネガティブコントロール実験も同時に行っています。PEPとGenomiPhiにて増幅したDNAに関して、ゲノムDNA量、ミトコンドリアDNA量、*Streptococcus* DNA量をPicoGreenにて定量しました。PCRの鋳型に使用可能なヒト核由来DNA量は*cmcy*遺伝子をreal-time PCRにて定量することにより確認しました。*cmcy*アッセイはヒト由来DNAを用いてキャリブレーションしました。またミトコンドリアDNA量はcytochrome *b*遺伝子をreal-time PCRで定量することにより確認しました。このアッセイに関するキャリブレーションはクローニングされたcytochrome *b*遺伝子をもとに行い、結果はcytochrome *b*遺伝子コピー数で示しました。cytochrome *b*遺伝子コピー数はミトコンドリアDNAコピー数に比例すると仮定して実験を行っています。3番目のreal-time PCRによる検証作業は、*Streptococcus* 由来の16Sリボゾーム遺伝子量を測ることにより、口内洗浄液中の*Streptococcus* 菌のゲノムDNAがGenomiPhiにて増幅されていないかを確認しました。

結果と考察

ヒトゲノムDNAが均一に増幅されていることを確認するために、3つのマイクロサテライトTHO-1、D5S592、D10S526、XとY染色体のアメロゲンニ遺伝子上の3つのSNPサイト、アンドロゲンレセプター遺伝子上のCAGリピートに関して解析しました。PicoGreenでの定量結果とそれぞれの多型解析結果を表5-9にまとめます。

初めに2種類の増幅法でポジティブコントロールとして使用したλ DNAの増幅率を比較しました。それぞれ鋳型として1 ngのλ DNA（全長45 kb）を増幅させた結果、PEP法では約640倍の増幅率、GenomiPhiでは7,000倍以上の増幅率を確認できました。この結果からGenomiPhiの増幅性能が格段に優れていることがわかります。しかし、鋳型DNA量を10 ngに増やしても最終産物量に変化がなかったことから、1 ngの鋳型で反応が十分プラトーに達していることがわかりました。またλ DNAの増幅DNAにはヒト由来マイクロサテライトマーカ配列を含む副産物がないこともわかりました。

CEPHのヒトゲノムDNA 1.4 ngを鋳型に用いて増幅した場合も、GenomiPhiでは平均4,000倍の増幅が認められたのに対し、PEP法では平均754倍の増幅率でした。GenomiPhiで増幅したDNAを用いた多型解析はいずれも正確な結果が得られました。しかし、PEP法にて増幅したDNAではTHO-1マイクロサテライトに関して解析することができず、アメロゲンニアッセイでは解析ができなかったものが一つありました。これらの結果から、GenomiPhiによるDNA増幅法はPEP法と比べて増幅率、遺伝子情報保存のいずれにおいても大変優れていることがわかりました。

real-time PCRによる*cmcy*、cytochrome *b*、*Streptococcus*

表5-9. GenomiPhiおよびPEP法を用いたゲノムDNAの増幅と多型解析

Sample	A ₂₆₀	Gel	Pico Green	Gender	Androgen	TH0-1	D5S	D10S
lambda-1 ng-PEP	—	—	0.64 µg	—	—	no signal	no signal	no signal
lambda-1 ng-Phi	—	—	7.2 µg	—	—	no signal	no signal	no signal
lambda-10 ng-Phi	—	—	5.8 µg	—	—	—	—	—
Ceph-neat	1.7 ng	40kb-160kb	1.4 ng	XX	20/24	159/175	178/182	246/250
Ceph#1-PEP	—	200bp-2kb	1.3 µg	failed/XY	20/24	low signal	178/182	low signal
Ceph#2-PEP	—	200bp-2kb	1.12 µg	XX	20/24	low signal	178/182	246/250
Ceph#3-PEP	—	200bp-2kb	0.75 µg	XX	20/24	low signal	178/182	246/250
Ceph#1-Phi	16.9 mg	2kb-20kb	5.2 µg	XX	20/24	159/175	178/182	246/250
Ceph#2-Phi	13.5 mg	2kb-20kb	6.64 µg	XX	20/24	159/175	178/182	246/250
Ceph#3-Phi	33.4 mg	2kb-20kb	6.0 µg	XX	20/24	159/175	178/182	246/250
MW#4-neat	1.0 ng	—	0.82 ng	XX	20/24	163/171	178/182	194/198
MW#4-PEP	—	—	0.34 µg	XY/ XY	19/20/24	low signal	178/182	194/198
MW#4-Phi	—	—	5.1 µg	XX	20/24	163/171	178/182	194/198
MW#5-neat	1.0 ng	—	0.91 ng	XY	20/20	163/171	186/186	190/250
MW#5-PEP	—	—	0.62 µg	XY	20/20	low signal	186/186	190/250
MW#5-Phi	—	—	5.8 µg	XY	20/20	163/171	186/186	190/250
MW#6-neat	1.0 ng	—	0.41 ng	XY	20/20	163/171	186/186	190/250
MW#6-PEP	—	—	0.61 µg	failed/ XY	20/20	low signal	186/186	190/280
MW#6-Phi	—	—	5.1 µg	XY	20/20	163/171	186/186	190/250
C-3-neat	—	—	26.3 ng	FAILED no signal				
C-3-PEP	—	—	0.58 µg					
C-3-Phi	—	—	4.4 µg					
C-4-neat	—	—	25.3 ng					
C-4-PEP	—	—	0.38 µg					
C-4-Phi	—	—	3.5 µg					
WB-neat	—	—	0.67 ng					
WB-PEP	—	—	0.16 µg					
WB-Phi	—	—	6.5 µg					
water#1-Pep	—	0kb	0 µg					
water#1-Phi	—	0kb	0 µg					
water#2-Phi	—	0kb	0 µg					

初めの3行はλ DNAの増幅結果を示しています。これらの増幅DNAからはヒトマイクロサテライト解析でバックグラウンド以上のシグナルは検出されませんでした。「neat」はPEP法、GenomiPhiで増幅する際に使用した鋳型DNAを示しています。3種類の口内洗浄液から得られたDNA増幅産物の吸光度260 nmとPicoGreenアッセイによる定量結果、パルスフィールドゲル電気泳動によるDNAのサイズを表記しています。「Gender」の列はアメロゲンSNP解析にて決定された結果を示しており、オリジナルの鋳型での結果が一致したものを正しく解析できたものと判断しています。アンドロゲンの列は、それぞれのサンプルから得られたアンドロゲンレセプター遺伝子上のCAG反復配列のサイズを示しています。最後の3行は3種類のマイクロサテライトに関して解析した結果を示しています。

DNAの定量結果を表5-10にまとめます。GenomiPhi増幅DNAでは、PicoGreenで定量したDNA量とreal-time PCRで定量した*cmcy*量はほぼ同じ増幅率であることがわかりました。ところが、PEP法による増幅DNAでは、*cmcy*の増幅率は全DNA量から計算された増幅率より若干少ないことがわかりました。

また、cytochrome *b*遺伝子の増幅率はPEP法で5,000倍、GenomiPhiでは600倍と異なる結果が得られました。これらの結果は、PEP法ではミトコンドリアDNAを過剰に増やし、GenomiPhiではミトコンドリアDNAをあまり増幅しないことを示しています。また、どちらの手法を用いた場合も*Streptococcus* 由来の16Sリボゾーム遺伝子の増幅は確認されませんでした。

口内洗浄液からのDNAサンプルを定量PCRにより解析した結果を表5-11に示します。増幅したゲノムDNA中の*cmcy*量を測定した結果、GenomiPhiでは2,500倍から10,400倍増幅し、PEP法では460倍から1,000倍増幅していました。また、cytochrome *b*領域の増幅率はPEP法で6,000倍から26,000倍、GenomiPhiでは530倍から2,900倍であることから、ミトコンドリアDNAはPEP法で多く増幅されることが示唆されました。PEP法においてミトコンドリアDNAの増幅率がGenomiPhiよりも高い傾向はCEPH DNAでの定量結果と一致しました。口内洗浄液に含まれているバクテリアのゲノムDNAの増幅は両手法で認められ、GenomiPhiはPEP法よりもバクテリアDNAを多く増幅し、増幅率はGenomiPhiが2,500倍から6,900倍、PEP法では1,200倍から2,900倍でした。

表5-10. CEPHセルラインDNAサンプルでのPEP法とGenomiPhiの比較

		Template neat	GenomiPhi products	PEP products	Fold Amplification GPhi	PEP
CEPH 1	cMYC	1.3 ng	8,360 ng	596 ng	6,430	458
	CytoB	1.10E+06	7.28E+08	6.05E+09	661	5,500
	Strep	0	0	0		
CEPH 2	cMYC	1.3 ng	6,300 ng	518 ng	4,500	398
	CytoB	1.10E+06	6.62E+08	6.15E+09	601	5,590
	Strep	0	0	0		
CEPH 3	cMYC	1.3 ng	6,320 ng	658 ng	4,861	506
	CytoB	1.10E+06	5.84E+08	6.45E+09	530	5,863
	Strep	0	0	0		

PEP法またはGenomiPhiにてCEPH DNAを3回ずつ（CEPH-1,2,3）増幅した結果です。real-time PCRによる*cmyc*, *cytochrome b*, *Streptococcus* 16Sリボソーム遺伝子の結果を示しています。

表5-11. 口内洗浄液3サンプル（4,5,6）でのPEP法とGenomiPhiの比較

		Template neat	GenomiPhi products	PEP products	Fold Amplification GPhi	PEP
口内洗浄液-4	cMYC	0.418 ng	4,360 ng	236 ng	10,430	564
	CytoB	4.36E+04	1.28E+08	1.13E+09	2,935	25,917
	Strep	0.187 ng	867 ng	278 ng	4,636	1,486
口内洗浄液-5	cMYC	1.7 ng	4,336 ng	784 ng	2,550	461
	CytoB	5.75E+05	3.06E+08	3.60E+09	532	6,260
	Strep	0.409 ng	1,038 ng	531 ng	2,537	1,298
口内洗浄液 -6	cMYC	0.288 ng	2,724 ng	309 ng	9,458	1,073
	CytoB	1.05E+05	2.92E+08	1.51E+09	2,181	14,381
	Strep	0.318 ng	2,199 ng	925 ng	6,915	2,908

cmyc, *cytochrome b* 遺伝子と *Streptococcus* 16S リボソーム遺伝子の定量PCRの結果をそれぞれの列に示しています（cMYC, CytoB, Strep）。

以上のことから、GenomiPhiはゲノムDNAをミトコンドリアDNAやバクテリアDNAの存在下で効率良く増幅し、増幅DNA中のミトコンドリアDNAやバクテリアDNAの比率が低いことがわかりました。一方、PEP法ではゲノムDNAよりもミトコンドリアDNAやバクテリアDNAの増幅効率が高く、増幅DNA中にはミトコンドリアDNAやバクテリアDNAが多く含まれていることがわかりました。

骨および長期保存した血漿から抽出したDNAの定量結果を表5-12に示します。きわめて微量のゲノムDNAがあるかどうか*cmyc*アッセイで確認した結果、GenomiPhiでは*cmyc*の増幅を確認することはできませんでした。しかし、*cytochrome b*はいずれの方法でも検出され、これまでの実験結果と同様にPEP法においてGenomiPhiよりもミトコンドリアDNAの増幅効率が高いことがわかりました。PEP法で増幅されたミトコンドリアDNAのD-loop領域はシーケンシング解析から塩基配列を確認することができ（データ未掲載）、GenomiPhiで増幅したミトコンドリアDNAについてもDynamic ET Terminator Cycle Sequencing Kitを用いて解析を行いました。図5-16～17に示したGenomiPhiで増幅した骨DNAと長期保存した血漿DNAのD-loop領域の解析結果からハプロタイプが確認でき、GenomiPhiでミトコンドリアDNAが正確に増幅されてい

ることがわかりました。ここで解析したハプロタイプはサンプルに使用した生物種で安定して保存されているものです。これらの結果からGenomiPhiはミトコンドリアDNAの増幅効率はPEP法ほど高くありませんが、DNA配列を忠実に増幅していることが示されました。

以上の結果からゲノムDNAを増幅してその後の解析を行うには、GenomiPhiによる増幅法が効果的であるということがわかりました。GenomiPhiはゲノムDNAの増幅率が高く、また増幅したDNAを多型解析に使用した場合の再現性の高さも証明できました。一方、PEP法はミトコンドリアDNAの増幅率が非常に高いことが*cytochrome b*遺伝子の増幅量より確認されました。また、GenomiPhiのミトコンドリアDNA増幅率はPEP法と比べると低いことがわかりましたが、GenomiPhiで増幅したミトコンドリアDNAのD-loop多型解析を問題なく行うことができました。そこで、小規模でミトコンドリアDNAを解析する場合にはGenomiPhiを利用することが可能ですが、大規模にミトコンドリアDNAを解析する場合にはPEP法が適しています。さらに、口内洗浄液からゲノムDNAを採取し多型解析を行う場合には、GenomiPhiによるDNA増幅が最適であるということも実証できました。

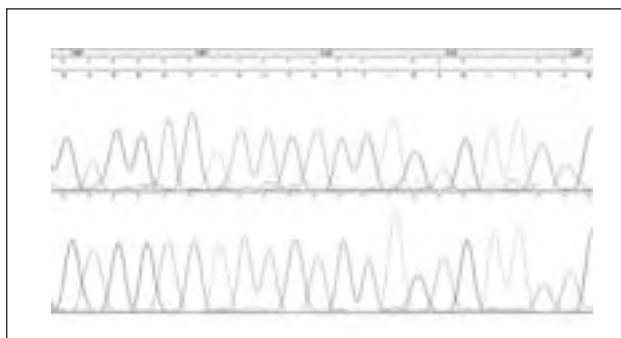


図5-16. 骨C4DNAサンプルのD-loop領域の塩基配列
(巻末カラーページ参照)

GenomiPhiにて増幅したDNAの塩基配列（上段）とオリジナルのDNAの塩基配列（下段）が一致していることがわかります。

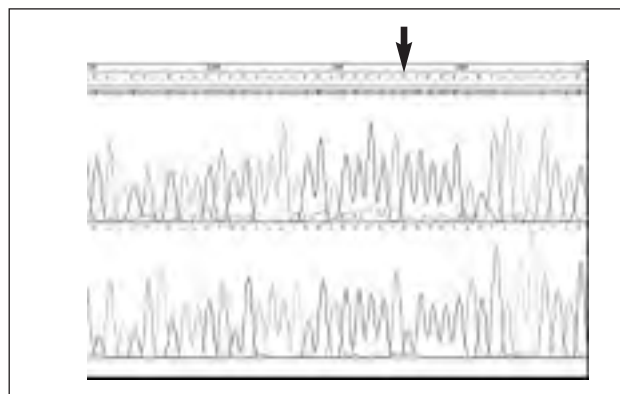


図5-17. 血漿DNAサンプルのD-loop領域の塩基配列
(巻末カラーページ参照)

GenomiPhiにて増幅したDNAの塩基配列（上段）とオリジナルのDNAの塩基配列（下段）が一致していることがわかります。矢印で示しているところがAからCに変異するハプログループ2の領域です。

表5-12. 骨DNAサンプルと血漿DNAサンプルでのPEP法とGenomiPhiの比較

		Template neat	GenomiPhi products	PEP products	Fold Amplification GPHi	PEP
骨C-3	cMYC	not detected	2.0 ng	2.0 ng	—	—
	CytoB	1.50E+04	3.98E+04	4.82E+06	2.65	321
	Strep	0	0	0		
骨C-4	cMYC	0.02 ng	not detected	3.5 ng	—	175
	CytoB	1.12E+03	8.12E+04	6.40E+06	72.5	5,714
	Strep	0	0	0		
WB	cMYC	0.31 ng	2.0 ng	10.0 ng	6.45	322
	CytoB	1.40E+03	5.72E+06	2.00E+07	4,085	14,286
	Strep	0	0	0		

2種類の骨DNAサンプル（C3, C4）と血漿DNAサンプル1種類をPEP法とGenomiPhiにて増幅し、*cmyc*, cytochrome *b* 遺伝子と *Streptococcus* 16Sリボソーム遺伝子の定量PCRの結果を示しています（cMYC、CytoB、Strep）。

要約

- GenomiPhiを使用したゲノムDNA増幅法はPEP法に比べて増幅効率が高いことがわかりました。
- GenomiPhiで増幅したDNAはマイクロサテライト解析、SNP解析、STR解析において、オリジナルのDNA配列を忠実に反映していることを実証できました。
- GenomiPhiではミトコンドリアDNAの増幅効率が低いことがわかりましたが、D-loop多型解析には十分量のDNAを得ることができました。
- PEP法では口内洗浄液サンプル中の*Streptococcus*ゲノムDNAや、ミトコンドリアDNAを過剰に増幅することがわかりました。

5.9 GenomiPhi増幅DNAを用いた エキソヌクレアーゼIII遺伝子のクローニングと発現

特殊な環境下で生存している微生物は、実験室で培養して研究することが非常に難しく、複雑な組成の培地や培養環境の開発が必要で、その開発には時間やコストがかかり、効率的な作業ではありませんでした。GenomiPhiは微量のゲノムDNAを大量に増幅させる手法で、従来の培養法による微生物の増殖が必要ありません。また、増幅されたDNAは直接その後のPCRやクローニングなどの実験に使用することができます。

本項ではグリセロール保存した*Thermoplasma volcanium*から培養を行わず直接ゲノムDNAの増幅を行い、ショットガンライブラリーを作製してシーケンシング解析を行いました。また、増幅したDNAを鋳型としたPCR後にエキソヌクレアーゼIII遺伝子をクローニングし、ベクターに組込んで大腸菌で発現させたプロトコールと結果を紹介します。

使用した製品

☐ GenomiPhi DNA Amplification Kit	25-6600-01
☐ TempliPhi 10000 DNA Amplification Kit	25-6400-01
☐ dNTPs (それぞれ100 mM)	27-2035-01
☐ 100 Base-Pair Ladder	27-4007-01
☐ KiloBase DNA Marker	27-4004-01
☐ アガロース	US75817
☐ アフィニティー、イオン交換カラム	
☐ ÄKTA explorer 100	18-1112-41
☐ Typhoonバリアブルイメージアナライザー	
☐ MegaBACE 4000 DNA Analysis System	
☐ DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit	US81095

その他に使用する試薬等

- ☐ *Pfu* DNA polymerase and 10×Reaction buffer for *Pfu* (Stratagene)
- ☐ 6× loading dye (Promega)
- ☐ 大腸菌エキソヌクレアーゼIII (New England Biolabs)
- ☐ 12% Tris-Glycine precast gel (Novex / Invitrogen)
- ☐ *Thermoplasma volcanium* culture (ATCC)
- ☐ サーマルサイクラー
- ☐ プライマー1 (Operon)
5' CGGGGTACCGTGAGT GAAACAAAAAATTC 3'
- ☐ プライマー2 (Operon)
5' TGCTCTAGAGCATTATATCAATTCTAGC 3'

プロトコール

グリセロールストック中の*T. volcanium*ゲノムDNAの増幅

*Thermoplasma*は嫌気性従属栄養細菌で、生育の至適温度は60°Cです。*Thermoplasma volcanium*を保存してあるグリセロールストックから直接GenomiPhiによりDNAを増幅し、増幅DNAを用いショットガンライブラリーを作製しました。このライブラリーから384ウェルのグリセロールストックを作製し、TempliPhi DNA Amplification Kitにてプラスミドを調製し、シーケンシング解析を行い、データベースに公開されている配列と比較しました。

A. 溶菌

- 5 µlのグリセロールストック (*T. volcanium*) を95 µlの10 mM Tris (pH 8.0) に混合します。
- 95°Cで5分間加熱して細胞を分解します。
- 遠心により分解しなかった細胞や細胞片 (debris) をペレットにします。

B. DNAの増幅

ポイント

Phi29 DNA polymeraseによる非特異的反応が起こらないよう試薬の調製はすべて氷上にて行ってください。

- ステップA.の3) にて調製したサンプルを1 µlチューブにとり、9 µlのSample bufferを加えます。
- 95°Cにて3分間熱変性し、氷上にて4°Cまで急冷します。

ポイント

DNAにニックが入る原因になるので、熱変性は3分以上行わないでください。

- 3) 9 μ lのReaction bufferと、1 μ lのEnzyme mixを加えてよく混合します。

ポイント

Reaction bufferとEnzyme mixは、マスターミックスとして調製することも可能です。マスターミックスの調製は使用する直前に行ってください。

- 4) 30°Cにて16～18時間反応します。
- 5) 65°Cにて10分間インキュベートすることによりPhi29 DNA polymeraseを失活させます。
- 6) 反応産物は4°Cまたは-20°Cにて保存します。

***T. volcanium*のショットガンライブラリー作製、シーケンス解析、GenBankの配列情報との比較**

GenomiPhiにて増幅されたDNAを2～4 kbのサイズに切断し、pUC18に組み込んだゲノムライブラリーを作製しました。このライブラリーからクローンを単離し、TempliPhi 10000 DNA Amplification Kitにてプラスミドを増幅させました。その後、DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kitを用いてシーケンス反応を行い、MegaBACE 4000 DNA Analysis Systemにて解析しました。解析結果より1,305のDNAシーケンスが得られ、それらの平均解読塩基数は686塩基でした。解読率は*T. volcanium*の全ゲノムサイズ1.6 Mbの56%でした。GenBankのシーケンスデータと比較した結果、アセンブルデータから686個のギャップが見つかり、図5-18よりそれぞれのギャップの場所はゲノム上にランダムに存在していることがわかりました。シーケンスしたクローンは平均的にゲノムをカバーしていることから、GenomiPhiはゲノム配列を均一に増幅させていることが示唆されました。

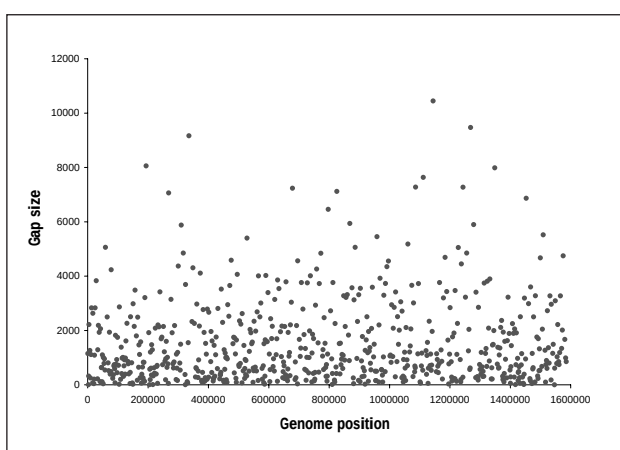


図5-18. GenomiPhi増幅DNAから作製した全ゲノムショットガンライブラリー (1,305) シーケンスギャップのサイズと位置

増幅した*T. volcanium*ゲノムDNAからのエキソヌクレアーゼIII 遺伝子のPCRによる増幅

PCRプライマーは*T. volcanium*のエキソヌクレアーゼ III 遺伝子を増幅するように設計しました。PCRは95°Cで45秒間熱変性を行った後、95°C 45秒間→58°C 45秒間→72°C 120秒間を35サイクル行い、最終伸長を72°Cにて10分間行いました。得られたPCR産物は2%のアガロースにて確認しました (図5-19)。

PCRにて増幅を行なったエキソヌクレアーゼIII 遺伝子のクローニングと発現解析

PCR産物を大腸菌発現ベクターにサブクローニングし、両方向からシーケンスすることによりインサートを確認しました。そして、エキソヌクレアーゼIII遺伝子をクローニングできたベクターを大腸菌にて発現させ、精製しました (図5-20)。

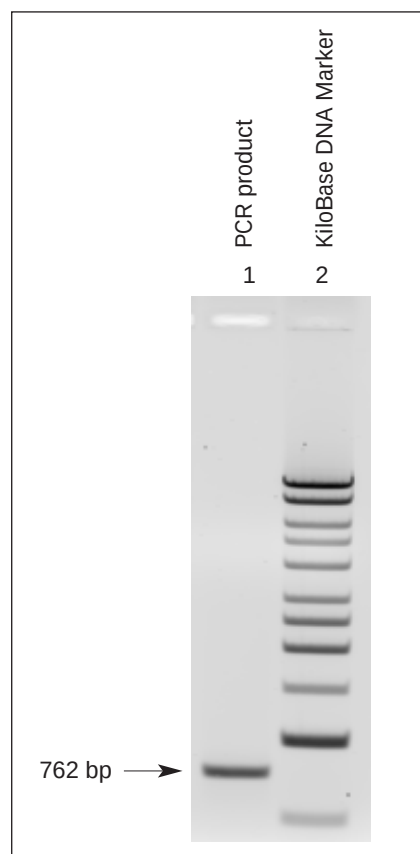


図5-19. GenomiPhiで増幅したDNAを鋳型として *T. volcanium* エキソヌクレアーゼ III遺伝子をPCRを用いて増幅

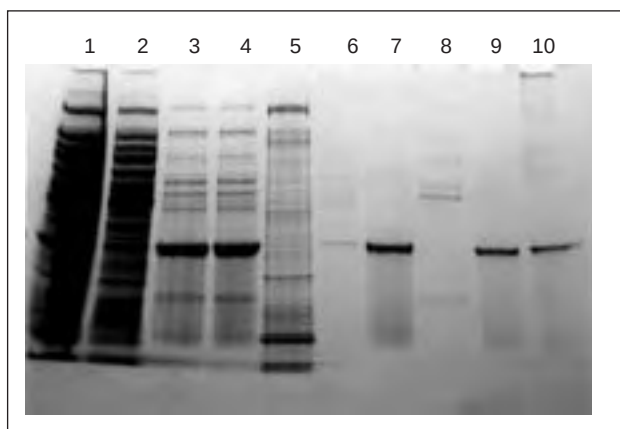


図5-20. 大腸菌の発現産物のそれぞれの精製段階をSDS-PAGE解析した結果

- レーン1：50℃で20分間溶菌処理したものの原液
 レーン2：アフィニティーカラム素通り画分
 レーン3：アフィニティーカラムのピーク溶出液
 レーン4：透析後のアフィニティー回収物
 レーン5：アフィニティーのサイドフラクション
 レーン6：イオン交換カラム素通り画分
 レーン7：イオン交換カラムのピーク溶出液
 レーン8：イオン交換のサイドフラクション
 レーン9：最終バッファー中の *T.volcanium* エキソヌクレアーゼⅢ遺伝子
 レーン10：大腸菌エキソヌクレアーゼⅢコントロール

表5-13. 作業時間の比較

作業内容	従来法	GenomiPhi
ATCC 569培地の調製	4 時間	なし
▼		
グリセロールストックからの培養	2～3 日	なし
▼		
シングルコロニーのピックアップと液体培養	2～3 日	なし
▼		
ゲノムDNAの抽出	2～4 時間	なし
▼		
GenomiPhi増幅反応	なし	16時間
Total time	約4～6 日	約16.5時間

結論

これまでバクテリアのゲノムライブラリーを作製するには多量で高純度のゲノムDNAを調製する必要がありました。GenomiPhiを使用することにより、従来の方法で数日から数週間かかっていたゲノムDNAの調製作業をわずか16～18時間で実施することを可能としました。全ゲノムのショットガンライブラリーから得られたシーケンスデータをNCBIの*T. volcanium*データベースと比較することにより、GenomiPhiは均一にゲノムDNA全体を増幅していることが確認できました。またGenomiPhiで増幅したDNAは遺伝子特異的なプライマーにてPCRを行うことで、簡単に目的の遺伝子を増幅させて発現ベクターにクローニングし、発現させることができました。

5.10 微生物のゲノムプロジェクト

自然界には数十万種類もしくは百万種類以上の微生物が存在するといわれていますが、全ては同定されていません。さらに、同定された微生物についてもそれぞれ培養方法が確立されていないためにサンプルを集めることが難しく、生物学的な解析はごく一部の微生物に限られています。微生物は有用物質を生産する一方で、人や家畜などの動物へ感染して病気をもたらすなど私たちと深いかかわりを持っていますが、私たちが微生物について知っていることはまだほんのわずかです。

もし培養方法が確立されていない微生物の微量ゲノムDNAを試験管内にてGenomiPhiにより増幅し、その全ゲノム情報を解読できれば、今まで未知であった新規な有用遺伝子を多数発見する糸口になります。その結果、病原細菌や抗生物質生産菌の解析は病原遺伝子や二次代謝産物に関連した遺伝子の解明など医療分野での貢献が期待できます。さらには、発酵細菌、海洋細菌、土壌細菌などのゲノム解析は有益でさまざまな遺伝子資源を提供でき、食生活（健康）、環境、エネルギーなどの人間社会に密着した分野への応用に新たな道を開くことが期待されます。

本項では、北里大学 北里生命科学研究所 創薬科学部門 ゲノム情報学研究室の山下先生・服部先生のご協力を得て行ったGenomiPhi増幅ゲノムDNAのシーケンス解析について紹介します。

まずはじめに、モデル実験系を構築するために、既知微生物である1.3 Mbの*Mycoplasma penetrans*より精製したゲノムDNAの希釈系列（10 ng～10 fg）を作り、それぞれGenomiPhiを用いて増幅したDNAからゲノムライブラリーを作製して、ショットガン・シーケンシングを行いました。

1 ng～1 pgまではほぼ同じ量のDNAがGenomiPhiによって増幅されていることが分かります（図5-21A）。これらからそれぞれせん断処理によってDNAを約2 kbpの断片に短くしてベクターへ組み込み（図5-21B）、ランダムに約1,000クロンを選んで両方向からシーケンシングし

ました。その結果、10 ngおよび1 ngのゲノムDNAからGenomiPhi増幅した場合、全てのクローンは*M. penetrans*由来のもので、1 pgのゲノムDNA（～10³個の微生物に相当）から増幅した場合でも約90％は*M. penetrans*由来のクローンでした（表5-14、図5-22）。残りの約10％のクローンはGenomiPhiの製造工程で用いる組換え大腸菌由来のDNAなどが含まれていました。また、これらのクローンがゲノムのどの領域をカバーしているのか確認したところ、ほぼ全域から片寄りなくシーケンシングができていることが分かりました。これはゲノムのほぼ全領域からDNAがランダムに増幅されていることを示唆しています（図5-23）。

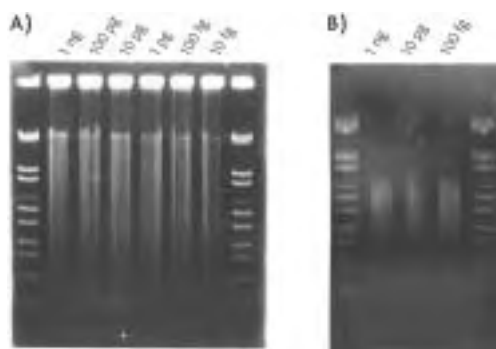


図5-21. *M. penetrans*ゲノムDNA希釈系列のGenomiPhiによる増幅

- A) 1 ng～10 fgの範囲で10倍希釈したゲノムDNA（国立感染症研究所・佐々木裕子先生よりご提供）をプロトコールにしたがってGenomiPhiによる増幅を行い、アガロースゲル電気泳動により確認しました。1 ng～1 pgまではほぼ同様に増幅していますが、100 fg以下では増幅効率が低下しています。
- B) GenomiPhi増幅DNAをせん断処理により約2 kbの断片にして、ベクターにライゲーションし、それぞれ約1,000クロンをショットガン・シーケンシングにより解析しました。

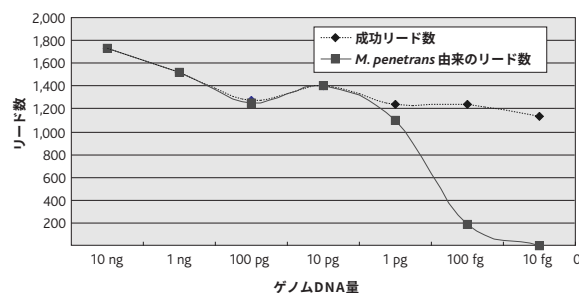


図5-22. ショットガン・シーケンシング解析のまとめ

表5-14をグラフ化した図です。数百分子相当のゲノムDNAからでもシーケンシング解析が可能であることが分かります。

表5-14. ショットガン・シーケンシング解析のまとめ

1 pg以上のゲノムDNAを用いた場合、90%以上が*M. penetrans*由来のクローンでした。

ゲノムDNA量	10 ng	1 ng	100 pg	10 pg	1 pg	100 fg	10 fg
理論上の細胞数	6,713,522	671,352	67,135	6,714	671	67	7
解析したコロニー数	1,056	1,056	1,056	1,056	1,056	1,056	1,056
シーケンス数 (両鎖)	2,112	2,112	2,112	2,112	2,112	2,112	2,112
成功リード数	1,727	1,519	1,275	1,408	1,239	1,244	1,132
<i>M. penetrans</i> 由来のリード数	1,727	1,519	1,251	1,401	1,094	187	4
上記以外のリード数	0	0	24	7	145	1,057	1,128

以上のことから、大量のサンプルを集めなくても GenomiPhiを用いてゲノムDNAを増幅すれば、今までは難培養で解析不可能であった微生物のゲノム解析を容易に進めることができます。

このように、GenomiPhiはDNA多型解析を容易にするだけでなく、ゲノムシーケンシング解析を進める上でも有用で、これまでに誰も成し得なかった解析を大きく推進し、ひいては生物学のニューパラダイム創出の引き金になることが期待されます。

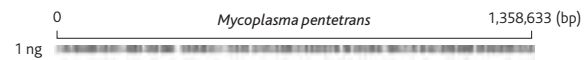


図5-23. シーケンシング解析したクローンがカバーする *M. penetrans*ゲノム領域

いずれのクローン群でもほぼ全域に渡ってクローンを得ていることから、GenomiPhiはほぼ全域にわたってゲノムDNAを増幅していることが分かります。

図5-21～23、表5-14の実験データは 北里大学 北里生命科学研究所 創薬科学部門 ゲノム情報学研究室 山下敦士先生・服部正平先生のご厚意によりご提供いただきました。

参考文献

- Zhang, L. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **89**: 5847-51 (1992).
- Le Marchand, L. and Lum, A. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **7**: 719-724 (1998).
- Trace Genetics, Davis, CA. DNA extraction with N-phenacylthiazolium bromide (PTB).
www.tracegenetics.com
- Morin, P. A. *et al.*, *Mol. Ecol.* **10**: 1835-1844 (2001).
- Martin, E. R. *et al.* *Am. J. Hum. Genet.* **67**, 383-394 (2000)
- Esterbauer, H. *et al.* *Nature Genet.* **28**, 178-183 (2001)
- Hugot, J. C. *et al.* *Nature* **411**, 599-603 (2001)
- Kruglyak, L. *Nature Genet.* **22**, 139-144 (1999)
- Telenius, H. *et al.* *Genomics* **13**, 718-725 (1992)
- Struan, F. A. *et al.* *Nucl. Acids Res.* **30**, e125 (2002)
- Lizardi, P. M. *et al.* *Nature Genet.* **19**, 225-232 (1998)
- Dean, F. B. *et al.* *Genome Res.* **11**, 1095-1099 (2001)
- Nelson, J. R. *et al.* *Biotechniques Jun;Suppl*, 44-47 (2002)
- Patki, A. H. and Nelson, J.R. *Genomic/Proteomic Technology* **2**, 28-31 (2002)
- Blanco, L. *et al.* *J. Biol. Chem.* **264**, 8935-8940 (1989)
- Blanco, L. and Salas, J. *Biol. Chem.* **271**, 8509-8512 (1996)
- Estaban, J. A *et al.* *J. Biol. Chem.* **268**, 2719-2726 (1993)
- Dunning, A. M. *et al.* *Nucl. Acids. Res.* **16**, 393 (1988)
- Walsh, P. S., *et al.* Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* **10** (4), 506-513 (1991).
- S & S IsoCode Card & Stix Protocol, Schleicher & Shuell (2001).

付録 Phi試薬アプリケーション例

Phi Circles

GenomiPhi DNA Amplification Kit

ゲノムDNA調製試薬

ここでは、GenomiPhi DNA Amplification Kitを実際に使用している先生方の実験について、実験方法ならびに結果を交えてご紹介します。いずれも、ニュースレター「Phi Circles」や弊社ホームページ等でもご覧いただけます。あわせてご利用ください。

- 極微量ヒト保存DNAの全領域のリアルタイムPCR、シーケンシング、多型解析 50
林 奉権 先生（放射線影響研究所 放射線生物学／分子疫学部）
- エタノール固定した魚卵を使用したマイクロサテライト法による親子判定.....51
国吉 久人 先生（広島大学大学院 生物圏科学研究科 分子生命開発学講座 細胞生理化学研究室）
- 変性組織から抽出したDNAの多型解析 52
松崎 雄三 先生（防衛医科大学校 法医学講座）
- イグサDNAの多型解析 53
土門 英司 先生（農業・特定生物産業技術研究機構 九州沖縄農業研究センター 作物機能開発部 育種工学研究室）
- 法医鑑識科学的資料からのDNA多型解析 54
王 秀玲 先生（東京女子医科大学 医学部 法医学教室）

極微量ヒト保存DNAの全領域のリアルタイムPCR、シーケンシング、多型解析

■ 出発材料

ヒト保存DNA

■ 使用アプリケーション

リアルタイムPCRを用いた増幅DNAの定量、
シーケンシング、SNP解析

😊 本キットの良いと感じている点

- 簡単に増幅ができる
- 極微量のDNAで増幅が可能である
- 多検体のサンプルを同時に処理する場合に特に有効

実験方法

1 GenomiPhi使用ステップ

■ 使用機種・試薬

PCR装置 (GeneAmp 9600)

■ プロトコール

ゲノムDNA 1 ml (1 ng) を Sample Buffer 9 mlに加えて
サンプル溶液を調製する

サンプル溶液を95 °Cで3分間インキュベートする

Reaction Buffer 9 mlとEnzyme Mix 1 mlを混ぜて調製した
酵素反応溶液を上記サンプルに加える

30 °Cで18時間インキュベートする

65 °Cで10分間インキュベートし、酵素を失活させる

2 その後のアプリケーションのステップ

■ 使用機種・試薬

1. リアルタイムPCR

装置: ABI PRISM 9700HT

試薬: TaqMan RNase P Control Reagent

TaqMan Universal PCR Master Mix

2. シーケンシング

試薬: DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit

3. SNPs analysis

装置: ABI PRISM 9700HT

試薬: Assays-by-DesignまたはAssays-on-Demand Productsと
TaqMan Universal PCR Master Mix

■ プロトコール

リアルタイムPCRによる増幅DNA量の定量

増幅DNA 1 mlにRNase P定量用のprimer&probe Mix 0.5 ml、TaqMan
Universal Master Mix 5 mlを加えABI PRISM 9700HTを用いてリアルタイムPCRによるRNase Pの定量を行なった。

ヒトHLA-AとHLA-B遺伝子(約2 Kb)のPCR増幅とシーケンシング

結果・コメント

Sample	Initial DNA (ng)	Final DNA (ng)	平均増幅DNA (ng) (Mean ± SD)
A	0.1	412	912.3 ± 830.5
B	0.1	1,871	
C	0.1	454	
A	1	1,954	1,972 ± 58.1
B	1	2,037	
C	1	1,925	
A	10	4,796	3,783.3 ± 1,446.2
B	10	4,427	
C	10	2,127	

本キットによるゲノム増幅は他のDOP-PCR、I-PEPなどの方法に比べて非常に効率がよいことがわかった。RNase Pの測定からDNAは約400から9,000倍に増幅されていると考えられた。また、本キットで増幅したゲノムDNAを鋳型としたPCRで2 kbのDNA増幅が可能であることがわかった。



研究室紹介

ご 所 属: 放射線影響研究所 放射線生物学／分子疫学部

お 名 前: 林 奉権 先生

ご研究内容: 免疫遺伝(Immunogenome)と疾患発症に関する研究。原爆被爆者の免疫機能に及ぼす放射線の影響。

エタノール固定した魚卵を使用したマイクロサテライト法による親子判定

■ 出発材料

エタノール固定した魚卵1個

■ 使用アプリケーション

マイクロサテライト解析

😊 本キットの良いと感じている点

- 反応が簡便
- 再現性が良い
- 予想以上にゲノムDNAが増幅される

実験方法

1 GenomiPhi使用ステップ

■ 使用機種・試薬

MJ RESEARCH MiniCycler

■ プロトコール

定法に従い、エタノール固定した魚卵1個ずつからゲノムDNAを調製し、100 μ lの滅菌水に溶解する

260 nmの吸光度から、各魚卵のDNA溶液の濃度は1 ng/ μ l前後であった。1 ng/ μ lのDNA溶液1 μ lにキットのSample buffer 9 μ lを加えて、ヒートブロックで95 $^{\circ}$ C、3分間インキュベートする

サンプル溶液を氷上にて急冷して、スピンドアウンする

Reaction buffer 9 μ lとEnzyme mix 1 μ lを混ぜた液(計10 μ l)を加え、30 $^{\circ}$ C、18時間インキュベートする

65 $^{\circ}$ C、10分インキュベートして、酵素を失活させる

2 その後のアプリケーションのステップ

■ 使用機種・試薬

装置: Eppendorf Mastercycler gradient

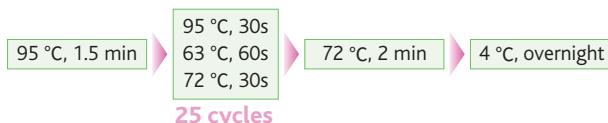
試薬: タカラバイオ TaKaRa Taq

■ プロトコール

PCR反応は反応液 20 μ l のスケールで行った。具体的な組成は以下の通り。

- 添付の10 $\times$ buffer 2 μ l
- primer-2 (10 μ M) 0.3 μ l
- dNTP (2.5 mM each) 1.6 μ l
- TaKaRa Taq (5 U/ μ l) . . . 0.1 μ l
- primer-1 (10 μ M) . . . 0.3 μ l
- 滅菌水 14.3 μ l
- ゲノムDNA (約1 ng/ μ l) またはGenomiPhi反応液 1 μ l

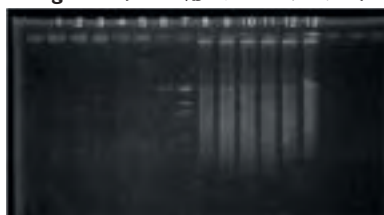
以下のPCR反応を行った。



PCR反応後、反応液5 μ lを使ってアガロース電気泳動(2 % agarose in 1 $\times$ TBE)を行った。

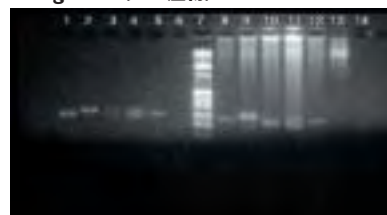
結果・コメント

A. Figure 1 (PCRに用いたDNAサンプル)



lane 1:	卵 No.1	ゲノムDNA 1 μ l (1.3 ng)
2:	卵 No.2	ゲノムDNA 1 μ l (1.2 ng)
3:	卵 No.3	ゲノムDNA 1 μ l (0.9 ng)
4:	卵 No.4	ゲノムDNA 1 μ l (1.6 ng)
5:	卵 No.5	ゲノムDNA 1 μ l (1.3 ng)
6:	control DNA	 1 μ l (10 ng)
7:	マーカー	
8:	卵 No.1	GenomiPhi反応液 . . . 1 μ l
9:	卵 No.2	GenomiPhi反応液 . . . 1 μ l
10:	卵 No.3	GenomiPhi反応液 . . . 1 μ l
11:	卵 No.4	GenomiPhi反応液 . . . 1 μ l
12:	卵 No.5	GenomiPhi反応液 . . . 1 μ l
13:	control DNA	GenomiPhi反応液 . . . 1 μ l

B. Figure 2 (PCR産物)



lane 1:	卵 No.1	ゲノムDNA . . . 1 μ l (1.3 ng)	⇒PCR反応
2:	卵 No.2	ゲノムDNA . . . 1 μ l (1.2 ng)	⇒PCR反応
3:	卵 No.3	ゲノムDNA . . . 1 μ l (0.9 ng)	⇒PCR反応
4:	卵 No.4	ゲノムDNA . . . 1 μ l (1.6 ng)	⇒PCR反応
5:	卵 No.5	ゲノムDNA . . . 1 μ l (1.3 ng)	⇒PCR反応
6:	control DNA	 1 μ l (10 ng)	⇒PCR反応
7:	マーカー		
8:	卵 No.1	GenomiPhi反応液 . . . 1 μ l	⇒PCR反応
9:	卵 No.2	GenomiPhi反応液 . . . 1 μ l	⇒PCR反応
10:	卵 No.3	GenomiPhi反応液 . . . 1 μ l	⇒PCR反応
11:	卵 No.4	GenomiPhi反応液 . . . 1 μ l	⇒PCR反応
12:	卵 No.5	GenomiPhi反応液 . . . 1 μ l	⇒PCR反応
13:	control DNA	GenomiPhi反応液 . . . 1 μ l	⇒PCR反応
14:	template なし (negative control)		

PCRの鋳型として、ゲノムDNA溶液1 μ lをそのまま使った場合 (lane1~5) と、ゲノムDNA溶液1 μ lを鋳型にしてGenomiPhi反応を行い、その反応液20 μ lのうちの1 μ lを使った場合 (lane8~12) とで、ほぼ同程度の量のPCR産物(マイクロサテライトを含む領域)が得られた。ゲノムDNA溶液はtotal 100 μ lあるので、GenomiPhiを使用しない場合は100回のPCRが行えるのに対して、GenomiPhiを使用した場合は2,000回ものPCR反応が行えることになる。したがって、解析したいマイクロサテライトのlocusが非常に多い場合には、GenomiPhiは極めて有効な手段であると考えられる。



研究室紹介

ご所属: 広島大学大学院 生物圏科学研究科 分子生命開発学講座 細胞生理化学研究室

お名前: 国吉 久人 先生

ご研究内容: 魚類の行動遺伝学

変性組織から抽出したDNAの多型解析

■ 出発材料

変性組織から抽出したDNA

■ 使用アプリケーション

STRマーカー検出のためのマルチプレックスPCR

😊 本キットの良いと感じている点

- 変性した試料にも有効
- nested PCRを行えない試料の初期増幅に有効
- 反応系が単純で簡単

実験方法

1 GenomiPhi使用ステップ

■ 使用機種・試薬

ウォーターバス

■ プロトコール

組織から抽出したDNA溶液1 μ l (1 ng)
↓
Sample Buffer 9 μ l加え95 $^{\circ}$ Cで3分間熱変性する
↓
Reaction Buffer 9 μ lとEnzyme Mix 1 μ lを混ぜた
酵素反応溶液 10 μ lを上記サンプルに加える
↓
30 $^{\circ}$ Cで18時間反応後、65 $^{\circ}$ Cで10分間
インキュベートして酵素を失活させる

2 その後のアプリケーションのステップ

■ 使用機種・試薬

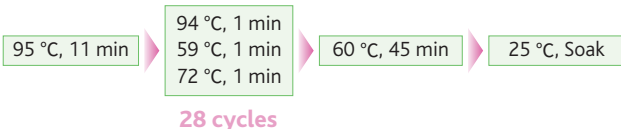
マルチプレックスPCR反応試薬 : AmpFLSTR Profiler PCR
Amplification Kit (Applied
Biosystems)
PCR装置 : iCycler (BIO-RAD)
電気泳動装置 : ABI PRISM 377XL DNA
Sequencer (Applied
Biosystems)

■ プロトコール

Multiplex PCR

GenomiPhi反応液をSephadex G-50カラムで精製し、精製DNAの2 ng、10 ngと50 ngについてAmpFLSTR Profiler PCR Amplification Kitを使用し下記の条件で反応。

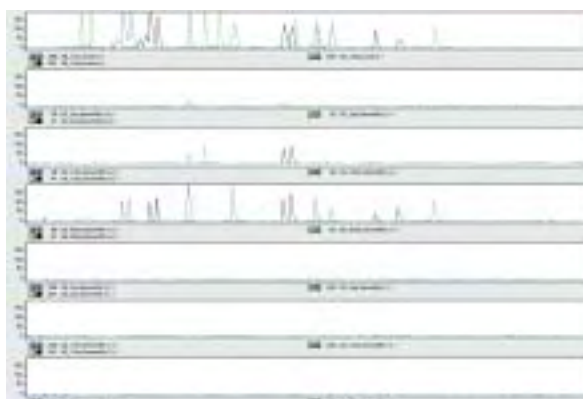
サイクル条件



泳動条件

PCR反応液2 μ lとloading Buffer 3 μ lを加え1 μ lをシーケンサーゲルにアプライ

結果・コメント



- ・ GenomiPhiを使用することで変性DNA試料を増幅することができた。
- ・ GenomiPhiで増幅したDNAと組織から抽出したDNAを鋳型として同量使用したマルチプレックスPCRの結果を比較すると、GenomiPhi増幅DNAからはPCR産物が得られたが、増幅していないDNAからは得られなかった。
- ・ 増幅された産物の増幅効率にバラツキが認められた。



研究室紹介

ご 所 属 : 防衛医科大学校 法医学講座

お 名 前 : 松崎 雄三 先生

ご研究内容 : ① ヒトの個体識別

② アライグマなど移入動物の個体識別マーカーの検索とそれを用いた繁殖動態調査

イグサDNAの多型解析

■ 出発材料

微量のイグサ (*Juncus effusus* L.) ゲノムDNA

■ 使用アプリケーション

Simple Sequence Repeat (SSR) 多型解析

😊 本キットの良いと感じている点

- PCRと比較してslippageの頻度が低いと考えられる
- DNA抽出が困難な植物についても、抽出された微量のDNAを増幅することができる

実験方法

1 GenomiPhi使用ステップ

■ 使用機種・試薬

ABI GeneAmp PCR System 9700
Hoechst 33258染色液
蛍光分光光度計 (日立、F-4010)

■ プロトコール

イグサ (*Juncus effusus* L.)、4系統のゲノムDNA各5 ngを供試し、標準的なプロトコールに従ってABI GeneAmp PCR System 9700を使用して、30度18時間の増幅反応を行った。増幅産物20 µlをTE Buffer (10 mM Tris-Cl, 1mM EDTA) で2倍希釈し、Hoechst33258染色液を使用して蛍光分光光度計 (日立、F-4010) でDNA濃度を測定した。

2 その後のアプリケーションのステップ

■ 使用機種・試薬

ABI GeneAmp PCR System9700
アガロースゲル電気泳動装置

■ プロトコール

増幅産物60 ngとCTAB法で抽出したゲノムDNAを供試して、SSR多型解析を行った。
SSR多型解析には4種類のプライマーセットを使用した。
PCR産物は3 %アガロースゲルで電気泳動しEthidium bromideで染色した。

結果・コメント

A.

品種	反復	濃度 (ng/µl)	標準誤差	収量 (µg)
A	3	194.5	2.83	7.8
B	3	186.3	0.84	7.5
C	3	209.7	10.29	8.4
D	3	219.1	1.14	8.8

B.



2-01B, 2-06F, 2-07F, 2-07Gは
プライマーの種類
レーン番号
1. 品種 A 2. 品種 B 3. 品種 C
4. 品種 D M. マーカー

A. Multiple displacement amplification (MDA) によって得られたDNA量

MDAにより全系統について約8 µgの増幅産物が得られた (左表)。1回のPCRに使用するゲノムDNA量は30~60 ngであることから、130~270回ものPCRが可能である。増幅産物の濃度標準誤差も十分に小さく、安定な増幅が得られている。

B. 4種類のSSRマーカーで増幅したイグサDNAの多型

SSR多型検出用のプライマーセットを使用してPCRを行った。
図に示したように、ゲノムDNAとMDAで増幅したDNAではSSRのパターンは品種間でほぼ保存されていた。一部、SSRマーカー2-07Fの品種D (レーン4) についてはゲノムDNAを鋳型とした場合2本のバンドが増幅されるが、MDA由来のPCR産物ではそのうちの1本のバンドが薄くなる傾向が見られた。原因は不明である。
SSRを含む領域をゲノムDNAから増幅する場合、PCRのサイクルが多いと、アガロースゲル上のバンドが不鮮明になりがちである。これはDNA polymeraseのslippageによって反復部分でDNA断片の長さに違いが出るのが原因であると考えられる。本実験では、MDAで鋳型DNAを一旦増幅しているにもかかわらず、アガロースゲル上でのPCR産物のバンドの鮮明さはゲノムDNAから直接PCRを行った場合とほぼ同等である。

研究室紹介

ご 所 属： 農業・特定生物産業技術研究機構 九州沖縄農業研究センター 作物機能開発部 育種工学研究室

お 名 前： 土門 英司 先生

ご研究内容： 主要農作物を対象にDNAマーカーの開発、有用遺伝子の単離と構造解析、遺伝子導入法の開発および作出された形質転換作物の安全性の評価等の研究

法医鑑識科学的資料からのDNA多型解析

■ 出発材料

微量の毛髪、爪、唾液斑、精液斑、血痕

■ 使用アプリケーション

STR解析、SNP解析

😊 本キットの良いと感じている点

- 手間がかからない
- 1 ng以上のDNAを増幅することができる
- 増幅産物をSNPs解析およびSTR解析することができる

実験方法

1 GenomiPhi使用ステップ

■ 使用機種・試薬

PCR装置 (GeneAmp 2400)

■ プロトコール

1. サンプル : 毛幹部 (2 cm)、毛根部 (0.5 cm)、爪 (2 mg)、唾液斑 (0.5 cm×0.5 cm)、精液斑 (0.5 cm×0.5 cm)、血痕 (0.5 cm×0.5 cm)
2. DNA抽出 : ISOHAIR (NIPPON GENE) によるDNA抽出

3. ゲノムDNA増幅 : 抽出された1 ngのDNAをGenomiPhi DNA Amplification Kitで増幅
4. ゲノムDNAの精製 : 増幅されたDNAをセントリコンー100で精製

以上の方法は、添付のマニュアルにしたがって行った。

2 その後のアプリケーションのステップ

■ 使用機種・試薬

装置 : PCR装置 (GeneAmp 9700)
遺伝子解析装置 (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer)

SNPs用試薬 : 8ローカス (ss4947490、ss5013903、ss6658727、ss4974799、ss2924060、ss4974729、ss4019224、ss4974915)のプライマー、ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit、Shrimp Alkaline Phosphatase、Exonuclease I、GeneScan-120 LIZ size standard

STR用試薬 : AmpFLSTR Profiler PCR Amplification Kit GeneScan [ROX] 350 standard

■ プロトコール

1 8ローカスのSNPs解析

SNPs解析は、マルチプレックスPCRによりテンプレートDNA増幅を行い、残存したプライマーとdNTPをShrimp Alkaline PhosphataseおよびExonuclease IIにより除去した。得られたPCR産物を鋳型にしてSNP部位の直前に3'末端がくるように設定したプライマーと4色の蛍光に標識したddNTPを含むSnaPshot Multiplex Kitを加えてラベル用のPCRを行い、その産物をABI PRISM Genetic Analyzerにより分離し、付加された塩基の種類をその蛍光の色と移動度の違いで判定した。

1-1. マルチプレックスPCR増幅

PCR反応は、ゲノムDNA 10 ngを鋳型として、1×PCR Gold Buffer、0.2 mM dNTP Mix、10 pmol の各Primers、0.125 unit AmpliTaq Gold Polymeraseを含む総量25 µlの反応液で95 °C、10分間のプレヒート後、94 °C、15秒間で変性、65 °C、30秒間でアニーリング、72 °C、45秒間で伸長を35サイクル行った。

1-2. マルチプレックス塩基伸長反応

塩基伸長反応は、96 °C、10秒間で変性、50 °C、5秒間でアニーリング、60 °C、30秒間で伸長を25サイクル行った。

1-3. キャピラリー電気泳動

蛍光ラベルされた産物はABI PRISM 310 Genetic Analyzerを用いてキャピラリー電気泳動により、15 kV、60 °C、25分間の条件で分離した。分離された電気泳動のパターンはGeneScan Softwareにより、蛍光の色と移動度の違いで型判定を行った。

2 9ローカスのSTR解析

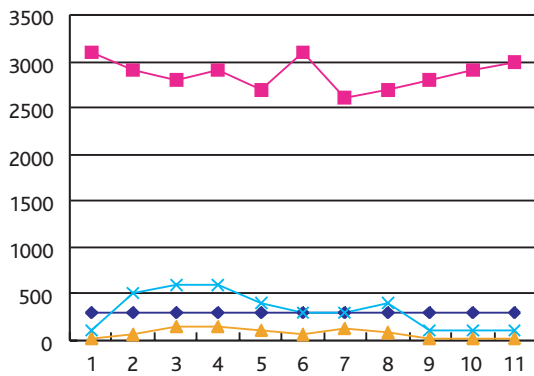
2-1. STR座位のPCR増幅

ゲノムDNA 4 µl (40 ng)、PCR Reaction Mix (AmpliTaq Gold PolymeraseおよびProfiler Primers Setを含む) 6.5 µlの反応液で95 °C、11分間のプレヒート後、94 °C、1分間で変性、59 °C、1分間でアニーリング、72 °C、1分間で伸長を28サイクルし、最後に60 °C、45分間で伸長を行った。

2-2. キャピラリー電気泳動

増幅された産物はABI PRISM 310 Genetic Analyzerを用いてキャピラリー電気泳動により、15 kV、60 °C、30分間の条件で分離した。分離された電気泳動のパターンは、GeneScan Softwareを用い、AmpFLSTR Allelic Laddersによる型判定を行った。

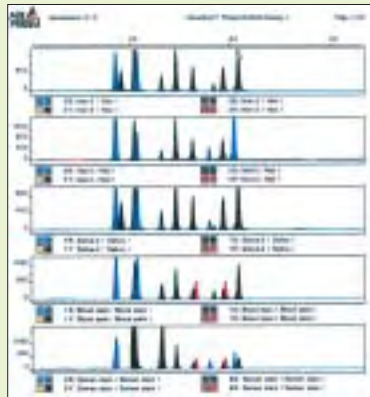
結果・コメント



GenomiPhi DNA Amplification Kitを用いた微量な法医学科学的試料からの遺伝子解析(8ローカスのSNPsおよび9ローカスのSTR)が可能であり、法医学実務の個人識別や犯罪捜査などへの応用が高いものと考えられた。

1

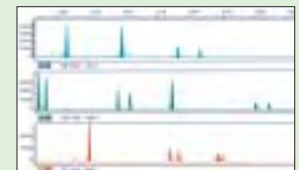
SNPs解析の結果



8ローカスのSNPs多型

Sample	Haplotype							
Hair	GA	AG	A	A	C	A	C	A
Nail	G	AG	A	A	C	G	C	G
Saliva	GA	AG	A	A	C	GA	C	A
Blood stain	G	AG	A	A	CT	A	CT	A
Semen stain	G	A	A	A	CT	G	CT	GA

STRの遺伝子型



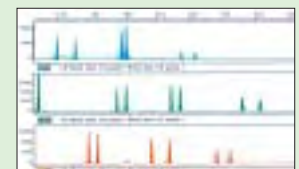
毛髪



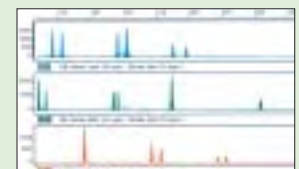
爪



唾液斑



血痕



精液斑

2

STR解析の結果

locus	hair	nail	saliva stain	blood stain	semen stain
D3S1358	16, 16	16, 16	15, 16	14, 18	13, 15
vWA	17, 17	17, 17	16, 18	17, 18	16, 18
FGA	21, 26	21, 26	23, 24	22, 25	20, 23
Amelogenin	XY	XY	XY	XX	XY
TH01	7, 10	7, 10	6, 9	7, 9	6, 7
TPOX	8, 8	8, 8	8, 11	8, 10	8, 8
CSFIPO	11, 14	11, 14	9, 12	8, 12	12, 12
D5S818	11, 11	11, 11	11, 14	11, 13	10, 10
D13S317	12, 14	12, 14	9, 9	8, 12	8, 10
D7S820	8, 9	8, 9	10, 12	8, 11	8, 10



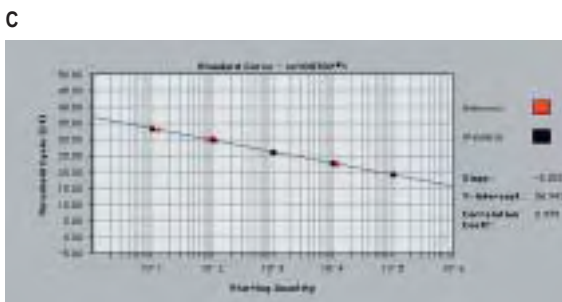
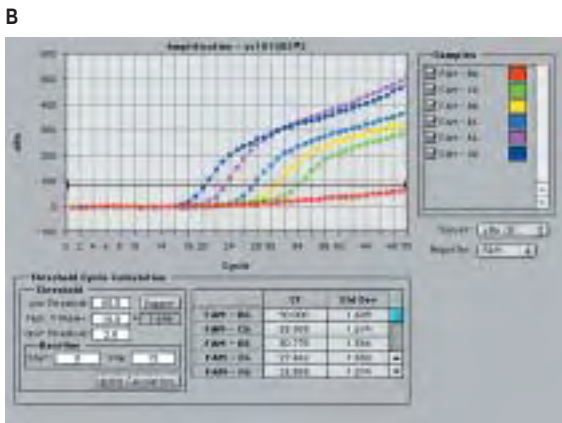
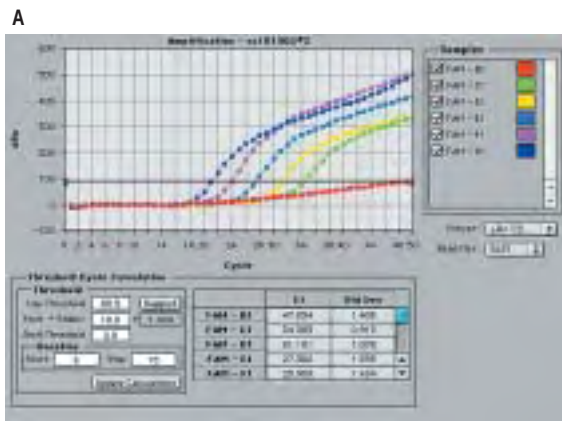
研究室紹介

ご 所 属：東京女子医科大学 医学部 法医学教室

お 名 前：王 秀玲 先生

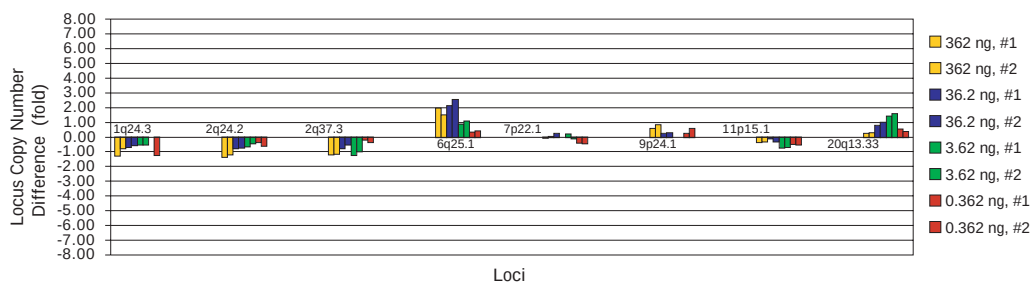
ご研究内容：ヒトの遺伝子解析、遺伝子同定、個人識別、親子鑑定、DNA抽出法・検査技術の開発





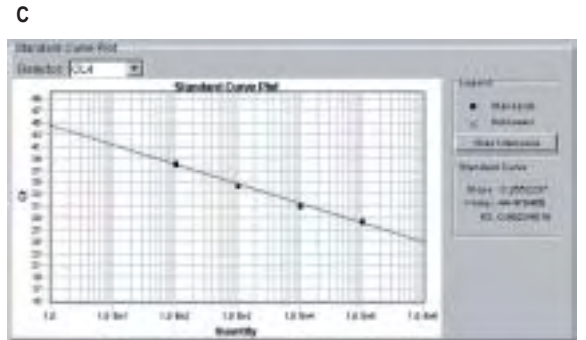
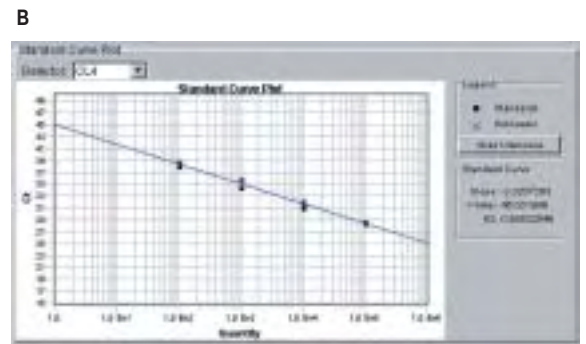
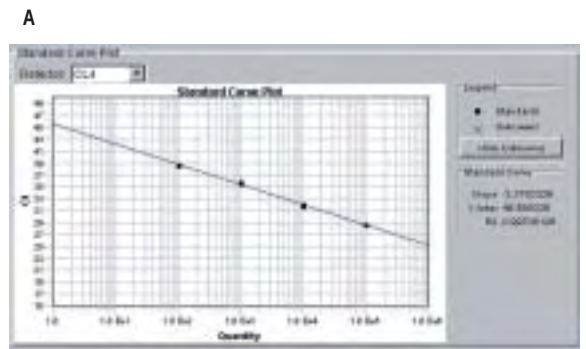
■ 本文29ページ

図5-7. 遺伝子座位7p22.1におけるヒトゲノムDNAとGenomiPhi増幅DNAのPCR増幅効率の比較



■ 本文42ページ

図5-16. 骨C4DNAサンプルのD-loop領域の塩基配列

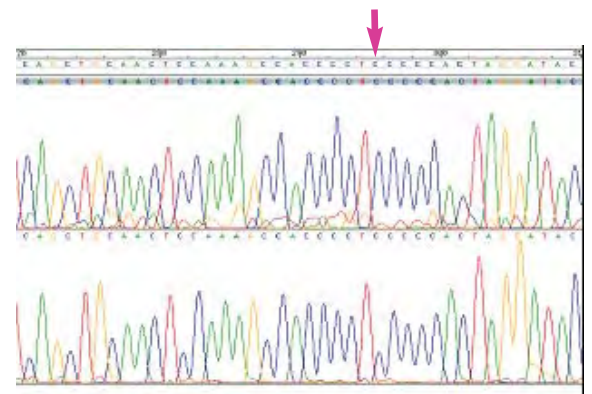
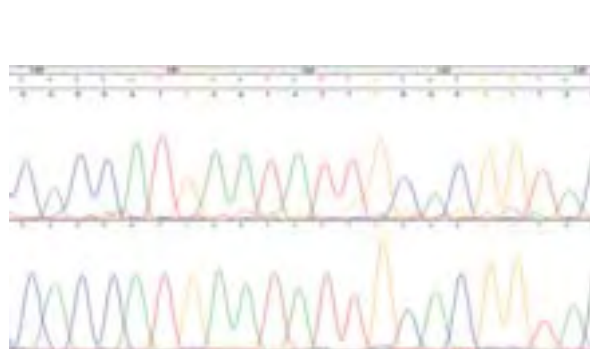


■ 本文29ページ

図5-8. 遺伝子座位20q13.33におけるヒトゲノムDNAとGenomiPhi増幅DNAのPCR増幅効率の比較

■ 本文30ページ

図5-9. ゲノムDNAとGenomiPhi増幅DNAの遺伝子座位のコピー数の比較



■ 本文42ページ

図5-17. 血漿DNAサンプルのD-loop領域の塩基配列



GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社

本 社 〒169-0073

東京都新宿区百人町3-25-1 サンケンビルディング

お問合せ：バイオダイレクトライン

TEL：03-5331-9336 FAX：03-5331-9370

e-mail：Tech-JP@ge.com



ISO 9001:2000認証取得

Home Page <http://www.gehealthcare.co.jp/lifesciences>

掲載されている製品の名称、仕様、価格などは、予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。
掲載されている社名、製品名は各社の商標または登録商標です。

この印刷物は、再生紙を使用し大豆インキにて印刷しています。

04.12.10 (NS)